Aus der Universitäts-Frauenklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. K. H. Wulf

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON PROSTAGLANDIN F IM SCHWANGERENPLASMA

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Albert
aus Bingen

1980

Würzburg, den 2.11.1979

Aus der Universitäts-Frauenklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. K. H. Wulf

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON PROSTAGLANDIN F IM SCHWANGERENPLASMA

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Albert
aus Bingen

Würzburg, den 2.11.1979

Referent:	Prof. Dr. med. H. BRANDAU
Korreferent:	Prof. Dr. med. K.H. WULF
Dekan:	Prof. Dr. med. K.H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 6.5.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALT

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	1. Prostaglandine	2
	2. Radioimmunoassay	5
II.	MATERIALIEN und METHODE	7
III.	ERGEBNISSE	20
	A. Extraktion	20
	B. Chromatographie	21
	C. Radioimmunoassay	23
	1. Bestimmung von PG-F in Plasmaproben	23
	2. Kontrollversuche zum Assay	27
	3. Auswertung der Plasmaproben nach neuem Versuchsaufbau	45
IV.	DISKUSSION	61
V.	ZUSAMMENFASSUNG	65
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	I - IX

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0088

I. E I N L E I T U N G

Vorzeitige Geburtsbestrebungen durch Wehentätigkeit vor der 38. SSW sind eine der wichtigsten Ursachen für Frühgeburten. Ihr Anteil an der Gesamtgeburtenzahl wird mit 6 - 8 % angegeben (MOSLER 1969, HÜBSCHEN 1975, MARTIUS 1974), und etwa 70 % der verstorbenen Säuglinge waren Frühgeborene. Damit ist die perinatale Mortalität mit 60 - 80 % belastet (SCHMIDT-MATTHIESEN) und folglich in erster Linie ein Frühgeburtenproblem.

Zur Senkung der Frühgeburtenrate sind in Klinik und Praxis große Anstrengungen unternommen worden; an erster Stelle ist hier die konsequente Schwangerenvorsorge zu nennen. Sie leistet große Dienste bei der Selektion von normalen Schwangerschaften und Risikoschwangerschaften und schafft unter anderem die Voraussetzungen, drohende Frühgeburten frühzeitig einer intensiven Überwachung und Therapie zuzuführen.

Nachdem GOLDBLATT in England und EULER in Schweden 1935, unabhängig voneinander, die stimulierende Wirkung menschlicher Samenflüssigkeit auf die glatte Muskulatur entdeckten, und EMBREY 1966 die Wirkung von Prostaglandin auf die Uterusmuskulatur beschrieben hat, war neben der intensiven Forschung für die klinische Anwendung dieser Substanz auch eine physiologische Beteiligung von Prostaglandinen an der Wehenregulation diskutiert worden. Als KARIM 1966 der Nachweis von Prostaglandinen unter der Geburt gelang und die antiinflammatorischen Substanzen (Aspirin^{R}, Colfarit^{R}) als Hemmsubstanzen der Prostaglandinsynthese identifiziert wurden (MOSLER 1974, TWOMEY 1975), wurde Acetylsalicylsäure an der Universitätsfrauenklinik Würzburg von MOSLER 1972 erstmals zur Tokolyse eingesetzt.

In den bis jetzt vorliegenden Arbeiten sind erhöhte PG-Spiegel am Ende der Schwangerschaft nur in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen worden (D.A. JOHNSON et al. 1975, J.A. SALMON

et al. 1973, N. WIQUIST et al. 1975, M.J. KEIRSE et al. 1974). Bei der Untersuchung von Schwangerenplasma konnten bisher keine analogen Konzentrationsänderungen gefunden werden (H.C. BRUNNER et al. 1972, R.M. GUTIERREZ-CERNOSEK et al. 1972 und 1973, J.F. HENNAM et al. 1974, D.A. JOHNSON et al. 1975, S.C. TWOMEY et al. 1975).

Da die Prostaglandine nur in kleinsten Mengen vorliegen (pg-Bereich), ist der Nachweis nur mit dem Radioimmunoassay möglich, doch dieser wird zur Zeit noch nicht als standardisierter Assay angeboten. Dies erklärt auch die in der Literatur gefundenen großen Konzentrationsunterschiede für im Schwangerenplasma nachgewiesenes PG-F.

Die Bestimmung der Plasmakonzentration von Prostaglandin-F im Schwangerschaftsverlauf ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Neben der Erarbeitung eines Normalverlaufs von PG-F in der Schwangerschaft, ist eine frühzeitige Erkennung von Frühgeburtsbestrebungen durch einen eventuellen Anstieg von PG-F von besonderer klinischer Bedeutung.

1. PROSTAGLANDINE

In der Zeit zwischen 1933 - 1934 entdeckten, unabhängig voneinander, von EULER (1934) und GOLDBLATT (1933, 1935) die blutdrucksenkende Eigenschaft und die stimulierende Wirkung von menschlicher Samenflüssigkeit auf den nicht graviden Uterus. Erst 1957 konnten BERGSTRÖM und SJÖVALL zwei aktive Komponenten in rein kristalliner Form aus Schafssamenblasen isolieren und nannten diese Stoffe Prostaglandin E (später E_1 genannt) und Prostaglandin F (später $F_{1\alpha}$ genannt). Seit dieser Zeit ist eine große Anzahl verschiedener Prostaglandine isoliert, und in letzter Zeit sind auch durch Synthese neue Prostaglandine (GILLESPIE 1971) mit verschiedenster biologischer Aktivität entwickelt worden.

Die Prostaglandine leiten sich chemisch von C-20 Kohlenstoff-

atom-enthaltenden, ungesättigten Fettsäuren ab. Als Ausgangssubstanz ist die Arachnidonsäure anzusehen, und die Biosynthese wird durch ein Membranlipid in Gang gesetzt, welches auch der limitierende Faktor für die Prostaglandinsynthese ist. Auch die Phospholipide können Ausgangssubstanz der PG sein, wie theoretisch noch andere Lipide (im Einzelfall noch nicht endgültig geklärt). Die Prostaglandine sind in fast allen Geweben von Säugetieren nachgewiesen worden, in besonders hohen Konzentrationen in der Samenflüssigkeit von Menschen und Schafen. Auch in der Amnionflüssigkeit und in steigender Konzentration im Schwangerenplasma sub partu sind insbesondere die F-Prostaglandine nachgewiesen worden (ZAHRADNIK 1976, HILLARY und BRUNNER 1973, SALMAN und AMY 1973). Bei den Angaben über die gefundenen Konzentrationen teilen die Untersucher allerdings sehr unterschiedliche Ergebnisse mit, die von ca. 0,3 ng/ml bis 1,65 ng/ml in der Vorgeburtsperiode liegen.

Pharmakologische Wirkung

Prostaglandine und ihre Umwandlungsprodukte beeinflussen in zum Teil antagonistischer Weise biologische Prozesse.

Am Herzen wirken die Prostaglandine frequenzsteigernd sowie positiv inotrop. Insbesondere das PG-E_1 steigert deutlich die Coronardurchblutung durch eine Verbesserung des Ca-Loads (Ca-Influx). Der periphere Widerstand wird herabgesetzt durch direkten Angriff der E-Prostaglandine an der Niere. Es folgen Blutdruckabfall sowie Zunahme des Schlagvolumens und der Kontraktionskraft am Herzen. Die F-Prostaglandine haben bei verschiedenen Tierspezies einen unterschiedlichen Einfluß auf den Blutdruck. Auf den Stoffwechsel wirken die Prostaglandine antiphlogistisch und glykogenolytisch durch eine vermehrte Freisetzung von Catecholaminen.

Im Magen-Darm-Trakt wirken besonders E_1, E_2 und $F_{2\alpha}$ stark motilitätssteigernd. Eine deutliche Abnahme der Magensaftsekretion (HCl und Pepsin) bewirken E_1, E_2 und A_1.

Auf die glatte Muskulatur der Trachea und der Bronchien wirken die E- und F-Prostaglandine relaxierend.

Am nichtschwangeren menschlichen Uterus haben die PG zum Teil antagonistische Wirkungen. Während $F_{1\alpha}$ und $F_{2\alpha}$ den nicht graviden Uterus stimulieren, bewirken PG A, B und E eine Verminderung der Spontanmotilität. Die physiologische Bedeutung erklärt sich durch die Anwesènheit der verschiedenen PG während des Zyklus: Zum Zeitpunkt der Ovulation ein Überwiegen der PG-E (Ruhigstellung des Uterus zur Begünstigung der Spermienascension und Blastozysten-Implantation). Am schwangeren Uterus bewirken alle Prostaglandine eine Stimulation unterschiedlicher Intensität.

Für die F-Prostaglandine ist der Zusammenhang zwischen PG-Konzentration im Venenblut und Wehentätigkeit mit guter zeitlicher Korrelation u.a. von ZAHRADNIK (1976) und KARIM (1968) nachgewiesen worden.

Am Ovar stimulieren die PG die Steroidbildung. Die vasokonstriktorische Wirkung von PG-$F_{2\alpha}$ am Ovar bewirkt einen schnellen Untergang des Corpus luteum.

Anwendung der PG in der Frauenheilkunde

Nachdem von EULER und GOLDBLATT die Wirkung der Prostaglandine auf die glatte Muskulatur des Uterus entdeckten, war die klinische Forschung stark vorangetrieben worden und das Interesse nach der Anwendung der PG in allen Fachbereichen sehr groß. Es gibt jedoch bis heute nur in der Frauenheilkunde eine etablierte Anwendung der Prostaglandine. Nach HEINZL (1978) sind folgende Einsatzmöglichkeiten heute klinisch gebräuchlich:

1. Abortinduktion
2. Geburtseinleitung
3. Zervixdilatation

2. RADIOIMMUNOASSAY

Die radioimmunologische Methodik besteht auf der Bindung der nachzuweisenden Substanz an einen spezifischen Antikörper, der vorher durch Sensibilisierung in einer Tierspezies (z.B. Kaninchen) gewonnen wurde. Nach der Bindung der Substanz an den Antikörper wird das Gemisch mit einer bekannten Menge der gleichen Substanz, aber radioaktiv-markiert (z.B. ^{3}H) versetzt, wobei nun beide Substanzen in Konkurrenz um die Antikörperbindung stehen. Durch die Messung der Radioaktivität der gebundenen Substanz ist nun ein Rückschluß über die Menge der nachzuweisenden Substanz möglich. Durch Vergleichsmessungen mit bekannten Mengen an radioaktiver und nicht radioaktiver Substanz und nach Aufstellen einer Eichkurve, sind genaue Konzentrationsangaben möglich.

Die nachfolgende Übersicht zeigt den schematischen Ablauf des Radioimmunoassay für Prostaglandin-F.

SCHEMATISCHER ABLAUF DES RIA

AG (Prostaglandin F) + AK (Antiserum)

AG - AK - Komplex
+ freie AG + freie AK + markiertes Antigen AG^x (^{3}H - $PGF_{1\alpha}$)

AG - AK - Komplex
+ AG^x - AK - Komplex
+ freie AG
+ freie (markierte) AG^x + Dextran beschichtete Holzkohle zur Adsorbtion freier AK

AG - AK - Komplex
AG^x - AK - Komplex + freie AG + AG^x adsorbiert an Holzkohle

↓

Zählkammer

x = radioaktiv markiert

Das Prinzip des Assay beruht also auf der Konkurrenz von endogenem mit markiertem AG um die Bindungsstellen des AK. Je mehr endogenes PG-F vorhanden ist, um so größer ist die Anzahl von AG - AK - Komplexen und desto geringer die Zahl an AG^x - AK - Komplexen (d.h. geringe Radioaktivität der gemessenen Probe). Sowohl für die Wiederfindungskontrolle, als auch für den eigentlichen Assay ist der Gebrauch von ^3H $PGF_{1\alpha}$ (ca. 100 Ci/mmol) vorteilhafter, weil dies im Vergleich zu ^3H-$PG_{2\alpha}$ (ca. 15 Ci/mmol) wesentlich höhere spezifische Aktivität aufweist und deshalb kleinere Mengen eingesetzt werden können. Auch bei Bestimmung von $F_{2\alpha}$ im Plasma sollte als Tracer ^3H-$PGF_{1\alpha}$ eingesetzt werden. Die Kreuzreaktion der gruppengleichen Prostaglandine untereinander ist sehr konstant.

II. M A T E R I A L I E N UND M E T H O D E

MATERIALIEN

Reagenzien: Benzol, Äthanol, Äthylacetat und Methanol (Fa. Merck, Darmstadt)

Kieselsäure Mallinckrodt (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

Gelatine (Apotheke der Universitätskliniken Würzburg)

Scinti Gel (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

Tritium-markiertes Prostaglandin $F_{1\alpha}$ (Fa. New England Nuclear): 0,05 mCi/0,0002 mg - 0,5 ml Äthanol/Wasser Lot Nr. 769/06

Dextran beschichtete Holzkohle (250 mg Holzkohle + 25 mg Dextran)

Prostaglandin F - Standard: 10,0 ng in getrockneter, lagerungsfähiger Form (Fa. Calbiochem, La Jolla CA)

Antikörper gegen PG F: 1 ml in getrockneter und lagerungsfähiger Aufbereitung (Fa. Calbiochem, La Jolla, CA). Der aus Kaninchen gewonnene AK ist nach Angaben des Herstellers spezifisch für PG-F, und es ist eine zu vernachlässigende Kreuzreaktion mit anderen Prostaglandinen (A, B, E) nachzuweisen.

Phosphatsalz - Puffer: Mit aqua destillata auf 500 ml verdünnter Puffer (Fa. Calbiochem, La Jolla CA) (enthält: 0,01 M Phosphatsalz-Puffer, pH 7,4, 1 mmol EDTA, 0,01 % mertialate und 0,1 % Gelatine).

Zur Messung der Radioaktivität wurde ein Liquidscintillationanalyser der Fa. Philips verwendet.

METHODE

A. Klinische Methode:

Das für den Radioimmunoassay verwendete Plasma ist in der Zeit vom 27.11.1975 bis 27.2.1976 an der Universitätsfrauenklinik Würzburg von Schwangeren mit regelrechtem Schwangerschaftsverlauf in der 12. - 40. SSW gesammelt worden. Ab der 28. SSW wird durch CTG-Kontrolle eine vorzeitige Wehentätigkeit ausgeschlossen.

Das Blut wird mit einer Injektionskanüle aus den peripheren Armvenen in heparinisierte Plastikspritzen abgenommen und sofort in eisgekühlte Plastikzentrifugenröhrchen umgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung 2 - 3 Std. im Kühlschrank bei 4°C gekühlt.

B. Labormethode:

Das Blut wird ca. 10 min bei ca. 4000 U/min und 4°C zentrifugiert, dann das Plasma abgehoben und in 12 ml Reagenzgläser gefüllt und in Mengen zwischen 2-4 ml zur späteren Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren. Ein Teil des Plasmas wird sofort nach dem Zentrifugieren für den Radioimmunoassay weiterverarbeitet. Um sicherzustellen, daß das eingefrorene Plasma keine falschen Ergebnisse im RIA liefert, wird entsprechend der Empfehlung anderer Autoren (AULETTA 1973, E. VAN ORDEN 1973, JAFFE 1974) ein Teil des Plasmas sofort nach dem Zentrifugieren extrahiert, um es dann für die spätere Weiterverwendung in 1 ml Portionen bei -20°C einzufrieren. Die eingefrorenen Proben werden alle in einem Zeitraum von 6 Monaten für den RIA verwendet (s. AULETTA 1974). Das nicht extrahierte Plasma ist nach dem Auftauen noch einmal zur Trennung der durch die Kälte ausgefallenen Proteine zentrifugiert worden (ca. 5 min bei 4000 U/min).

Zur Durchführung des RIA sind die Plasmaproben nach folgendem Schema aufzubereiten:

Extraktion: Trennung der PG von den übrigen Plasmabestandteilen;

Chromatographie: Trennung der einzelnen PG-Gruppen wegen Interferenz des spez. AK zu anderen Prostaglandinen;

Radioimmunoassay.

Extraktion:

Die Methode der Extraktion von PG aus dem Plasma muß im wesentlichen drei Forderungen erfüllen:

1. Größtmögliche Rückgewinnung für die dem Plasma zugesetzten H^3-markierten PG, als ein Maß für die Spezifität der Methode.
2. Schnelle und einfache Handhabung, damit Störmöglichkeiten auf ein Minimum zu reduzieren sind.
3. Reproduzierbarkeit.

Die in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden geben Wiederfindungsraten zwischen 78 % und 97,6 % für H^3-markiertes PG-F an. Es werden die Methoden nach AULETTA (1973), VAN ORDEN (1973) und JAFFE (1974) durchgeführt, um die Spezifität der drei Methoden miteinander zu vergleichen. Die Auswahl richtet sich nach obigen Kriterien. Die Darstellung auf der nächsten Seite zeigt übersichtlich die drei Verfahren.

a) Extraktion nach D.E. VAN ORDEN (1973):

Ein Milliliter Plasma wird in ein im Eisbad befindliches, verschließbares und konisches 12 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit 0,1 ml 1 N HCl angesäuert. Dann werden 4 ml Äthylacetat in die Röhrchen gefüllt und der Inhalt ca. 5 min fest geschüttelt. Anschließend werden die Röhrchen bei 4°C und 1500 x g ca. 5 min zentrifugiert und dann der Überstand in ein anderes Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Dieser Extrakt wird unter einem leichten Luftstrom getrocknet.

VAN ORDEN	JAFFE	AULETTA
1 ml Plasma im Reagenzglas + 0,1 ml 1 N HCl	1 ml Plasma + 3 ml Petroleumäther	1 ml Plasma + 0,1 ml HCl (1 mol/l)
+ 4 ml Äthylacetat anschließend 5 min stark schütteln	Absaugen der organ. Phase	+ 5 ml redestilliertes Äthylacetat
Zentrifugieren bei 1500 x g und 4°C für 5 min	zur wässrigen Phase 3 ml (Äthylacetat, Isopropanol u. 0,1 M HCl = 3 : 3 : 1)	Zentrifugieren bei 1200 x g für 5 min
obere Phase in anderes Glas umfüllen und unter einem leichten Luftstrom trocknen	2 x 15 sec schütteln + 2 ml Äthylacetat + 3 ml Wasser	obere Phase in ein anderes Glas umfüllen + 5 ml Äthylacetat
	nach dem Mischen Trennung der Phasen mit der Zentrifuge	Zentrifugieren
	3 ml (von 3,5 ml) der organ. Phase wird in ein Reagenzgl. umgefüllt und bei 55°C in der Luft getrocknet.	Umfüllen Trocknen (55°C Luft)

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wird vorher 0,1 ml $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ (ca. 5000 CPM) in jedes Reagenzglas gegeben, und dieser Ansatz vor dem Einfüllen des Plasmas bei ca. 50°C eingetrocknet.

b) Extraktion nach AULETTA:

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wird in jedes Reagenzglas 0,1 ml eines Tritium-markierten Prostaglandins (ca. 800 CPM) für jede zu bestimmende PG-Gruppe dazugefügt. Dann wird 1 ml Plasma eingefüllt, der Ansatz geschüttelt und für ca. 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Später wird die Probe mit 0,1 ml HCl (1 mol/L) auf ca. pH 3,5 - 4,0 angesäuert. Jetzt wird die Probe mit 5 ml redestilliertem Äthylacetat extrahiert und dann für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein anderes Reagenzglas gefüllt. Der Ansatz noch einmal mit 5 ml Äthylacetat extrahiert, aufgeschüttelt und zentrifugiert. Der Äthylacetatextrakt (10 ml) bei ca. 55°C in Luft getrocknet.

c) Extraktion nach JAFFE (1974):

Zu 1 ml Plasma in konischen Zentrifugengläsern werden 13 pg (4000 CPM) $^{3}H\text{-}PGE_{1}$ in 50 µl zum Wiederfindungstest eingefüllt. Das Plasma wird zur Beseitigung der neutralen Lipide mit 3 ml Petroleumäther extrahiert. Nach dem Absaugen der organischen Phase wird zur wässrigen Phase 3 ml einer Lösung gefüllt, bestehend aus Äthylacetat, Isopropanol und 0,1 N HCl = 3 : 3 : 1 Volumenteile. Dieser Ansatz wird 2 mal für 15 sec geschüttelt, anschließend 2,0 ml Äthylacetat und 3,0 ml Wasser hinzugefügt. Nach dem Mischen werden die Phasen mit der Zentrifuge getrennt. 3 ml von 3,5 ml der organischen Phase werden in ein Polypropylen-Reagenzglas umgefüllt und in 55°C heißer Luft getrocknet.

Besondere Schwierigkeiten bereitet bei allen drei Methoden das Trocknen des organischen Extrakts. Die von den Autoren empfohlene Trockenzeit hätte fast zwei Tage gedauert, dies

scheint jedoch in Anbetracht der Empfindlichkeit der PG als wesentlich zu lang. Es wird zum Trocknen ein Excikatorbehälter in 50°C heißem Wasserbad verwendet, bei dem mittels Wasserstrahlpumpe ein Teilvakuum erzeugt werden kann. Bei der somit erreichten Siedepunktserniedrigung liegt die Trockenzeit bei ca. 2 Std. Es ist sichergestellt, daß der Ansatz nicht gesiedet hat.

Chromatographie:

Zur Gruppentrennung der Prostaglandine sind verschiedene Methoden beschrieben. Eine gute Darstellung der einzelnen Methoden beschreibt HORTON 1972. Eine einfache und doch sehr effiziente Methode ist die Kieselsäurechromatographie. Sie ist die am meisten angewandte Methode für Prostaglandin-F-RIA (VAN ORDEN 1973, AULETTA 1974, JAFFE 1974, BURTON 1971, PEXTON 1975, KEIRSE 1974, JALLIS 1974). Sowohl beim Aufbau der Säulen mit Kieselsäure, als auch im Gebrauch der verschiedenen Elutionslösungen ergeben sich Unterschiede bei den einzelnen Autoren. Es werden in Vorversuchen die Anleitungen nach VAN ORDEN (1973) und JAFFE (1974) erprobt und die Wiederfindungsrate für $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ gemessen.

Notwendige Lösungen für die Chromatographie:

Lösung I: Benzol : Äthylacetat : Methanol = 60:40: 0
Lösung II: Benzol : Äthylacetat : Methanol = 60:40:20
Lösung III: Benzol : Äthylacetat : Methanol = 60:40:10
Lösung IV: Benzol : Äthylacetat : Methanol = 60:40: 2

a) Chromatographie nach VAN ORDEN:

Als Säule wird eine zweieinhalb Milliliter große, zylindrische Glasspritze von 5 cm Länge benutzt. Filterpapier aus Glasfiber wird in Größe des Spritzendurchmessers auf den Boden der Spritze gelegt und zur Reduktion der Fließgeschwindigkeit eine Nadel auf die Spritze aufgesetzt.

Eine Aufschwemmung von Kieselsäure mit Lösung IV (25 mg/ml)

wird mit dem Magnetrührer hergestellt und bis zur 1,5 ml Marke in die Spritze eingefüllt.

Zum Einfüllen der Plasmaproben wird der nach der Extraktion eingetrocknete Extrakt mit 0,4 ml von Lösung III aufgelöst und dazu gut geschüttelt. Weitere 1,6 ml von Lösung I werden zur Probe gegeben und noch einmal gut geschüttelt, anschließend die Probe in die Säule eingefüllt. Das Probenglas wird noch einmal mit einem Milliliter von Lösung IV gespült und auch diese Spülflüssigkeit in die Säule gefüllt.

Zur Eluierung der "E"-Prostaglandine werden 12 ml von Lösung IV in kleinen Portionen zur Säule gegeben. Die "F"-Prostaglandine werden durch anschließendes Einfüllen von 4 ml Lösung II eluiert. Das Eluat wird in Reagenzgläsern aufgefangen und anschließend nach obigem Verfahren getrocknet.

b) Chromatographie nach JAFFE (1974):

Die Angaben von JAFFE unterscheiden sich in folgenden Punkten von obiger Beschreibung:

1. Die Aufschwemmung von Kieselsäure wird mit Lösung I vorgenommen.
2. Zur Lösung des Extraktionsextracts wird 0,2 ml Lösung III + 0,8 ml Lösung I verwendet.
3. Die Chromatographiesäulen sind mit Glaswolle am Boden abgedichtet.
4. Nach dem Einfüllen der Kieselsäureaufschwemmung wird diese mit 5 ml Lösung II und 1,5 ml von Lösung I gespült.
5. Zur Eluierung der einzelnen Prostaglandingruppen werden folgende Lösungen verwandt:
   Fraktion I: 6 ml von Lösung I (A+B-Prostaglandine)
   Fraktion II: 12 ml von Lösung IV (E-Prostaglandin)
   Fraktion III: 3 ml von Lösung II (F-Prostaglandin)

Für das Einfüllen der einzelnen Lösungen in die Säulen ist besondere Sorgfalt notwendig, damit eine Zerstörung der Säu-

lenoberfläche vermieden wird. Hierzu wird die Lösung tropfenweise am Innenrand der Spritze eingefüllt. Ein Schutz der Oberfläche mit Glaswolle kann diese Gefahr nicht wesentlich verkleinern. Als sehr vorteilhaft erweist sich das Aufreihen der einzelnen Säulen auf speziell dafür angefertigten Ständern, auf denen bis zu 10 Säulen nebeneinander befestigt werden. Damit ist es auch möglich, eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig zu chromatographieren. Die Chromatographie der gesammelten Plasmaproben wird einheitlich nach VAN ORDEN (1974) vorgenommen.

Radioimmunoassay:

Bei der Ausführung des Assay folgte ich den Empfehlungen des Herstellers, dessen Anleitung auf den grundlegenden Arbeiten von CALDWELL (1971) und JAFFE (1971) basiert.

1. 12 x 75 mm große Reagenzgläser werden, nachdem sie mit aqua destillata gewaschen und getrocknet sind, für den Assay vorbereitet.
2. Zur Gewinnung der Eichkurve werden bekannte Mengen an PG-F immer in zwei Reagenzgläser gefüllt, mit folgenden Konzentrationen: 0 pg, 1,95 pg, 3,90 pg, 7,81 pg, 15,62 pg, 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg, 500 pg, 1000 pg, hergestellt in einer Verdünnungsreihe. Dieser Ansatz wird dann nach dem oben beschriebenen Verfahren getrocknet.
3. Das eingetrocknete Eluat der Plasmaproben wird mit 1 ml Eluatflüssigkeit (Lösung II nach VAN ORDEN) wieder aufgelöst (5 min schütteln) und dann in Fraktionen zu 0,2 ml und 0,4 ml in die Reagenzgläser gefüllt und anschließend ebenfalls wieder getrocknet (Doppelbestimmung).
4. Zu jedem Reagenzglas wird 0,1 ml 1 : 50 verdünntes Antiserum gegeben. In zwei zusätzliche Plasmaproben wird statt des Antikörpers 0,1 ml Phosphatsalz-Puffer gegeben (-AK Kontrolle).

5. Das $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ wird zu einer Konzentration von 0,1 µCi/ml verdünnt. Davon wird 0,1 ml (10 nCi) zu jeder Probe gegeben.

6. Bei 4°C werden die Proben für 2 - 24 Std. inkubiert.

7. Zu jeder Probe wird 0,1 ml Phosphatsalz-Puffer mit 0,5 % Gelatine gegeben. Die Zugabe der Gelatine ist deshalb sehr wichtig, weil dadurch die Loslösung des $^{3}H\ PGF_{1\alpha}$ vom AK durch die Holzkohle im nächsten Schritt verhindert werden soll.

8. 1 ml einer Suspension von Dextran-Holzkohle in einer Konzentration von 25 mg Dextran + 250 mg Holzkohle in 100 ml Phosphatsalz-Puffer, wird zu jeder Probe gegeben, aufgeschüttelt und für 15 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Es ist darauf zu achten, daß die Holzkohlesuspension durch ständiges Rühren mit einem Magnetrührer in einer uniformen Suspension gehalten wird, weil es sonst zu einer sehr schnellen Sedimentation kommt.

9. Nach dem Zentrifugieren wird der überstehende Teil in die Zählröhrchen gefüllt, zur Bestimmung der noch vorhandenen Aktivität.

10. Die unbekannte Menge an PGF wird nun anhand der Eichkurve mit der zugesetzten Menge PGF verglichen.

C. Praktisches Vorgehen:

1. Bestimmung von PG-F in Plasmaproben

a) Plasmaproben

Es werden Plasmaproben von Schwangeren aus der 12. - 40. SSW untersucht. Das Plasma war nach dem Zentrifugieren etwa 1 bis 2 Monate eingefroren. Die Bestimmung im Radioimmunoassay erfolgte in 0,2 und 0,4 ml Fraktionen.

b) Eichkurve

Die Eichkurve wird nach Anleitung des Herstellers (s.S.14)

erstellt. Um Einflüsse der bei der Chromatographie benötigten Lösungsmittel mitzuerfassen, sind die Reagenzgläser wie folgt vorbehandelt worden:

3 ml Äthylacetat	Trocknen des Inhalts im Vakuum
+ 2 ml Lösung IV	"
+ 1 ml Lösung II	"

c) Wiederfindungstest für ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$

Für jede Plasmaprobe wird die Wiederfindungsrate für Extraktion und Chromatographie bestimmt, damit sich die Verluste durch diese Prozedur später rechnerisch ausgleichen lassen. Es werden 0,1 ml ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ (5 nCi/ml) mit ca. 500 CPM zur Plasmaprobe gegeben.

2. Kontrollversuche zum Assay

In diesem Teil der Arbeit werden die einzelnen Teilschritte des Assay genauer analysiert und durch zusätzliche Kontrollversuche die Leistungsfähigkeit des Antikörpers getestet. Durch diese Versuche soll erreicht werden, die Empfindlichkeit des Assay so zu steigern, daß der Ablesebereich für endogenes PG vom 90 %-Bereich der Eichkurve in einen tieferen Bereich verlegt wird.

a) Bindungskapazität

Die Bindungskapazität (BK) wird wie folgt bestimmt: 0,1 ml Puffer wird anstelle von PG-F in das Reagenzglas gegeben und mit der Probe weiterverfahren, beginnend mit Punkt 4 der Anleitung des Herstellers (s. Seite 14). Es wird die BK mit und ohne Lösungsmittelrückstand im Reagenzglas bestimmt, sowie mit verschiedenen Konzentrationen von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ und des Antikörpers.

Lösungsmittelrückstand:

3 ml Äthylacetat	Trocknen des gesamten Inhalts
+ 2 ml Lösung IV	"
+ 4 ml Lösung II	"

b) Absorption der Strahlung von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ durch Plasmarückstände (Q-Effekt)

Konzentration des eingesetzten ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$: 0,1 µCi/ml (ca. 10.000 CPM/Probe. 0,1 ml ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ wird in das Reagenzglas gegeben und 1 ml Puffer zugegeben. Nach dem Schütteln werden 0,8 ml dieses Ansatzes zur Auswertung im Scintillationszähler in die Zählröhrchen gefüllt.

c) Einfluß der Kontaktzeit der Holzkohle mit dem Reaktionsgemisch (Punkt 8 und 9 der Anleitung)

Es sind bisher immer nur 4 Plasmaproben gleichzeitig zur Adsorption der freien AG (PG) mit Dextran beschichteter Holzkohle gemischt und anschließend sofort zentrifugiert worden. In diesem Versuch soll die Variation der Kontaktzeit untersucht werden, die sich bei der Verarbeitung größerer Mengen von Plasmaproben ergibt.

Es sind 5 Eichkurven erstellt worden, die sich nur in den Kontaktzeiten der Holzkohle mit dem "Reaktionsgemisch" unterscheiden; von 0 min (nach dem Schütteln für 15 sec. sofort zentrifugieren) bis 4 min.

d) Empfindlichkeit des Antikörpers

Zur Prüfung der Empfindlichkeit des Antikörpers wird der für den Assay verwendete Antikörper in einer Verdünnungsreihe mit Puffer in niedrigeren Konzentrationen hergestellt und dabei die Bindungskapazität gemessen. Die Konzentration von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ ist 0,1 µCi/ml (ca. 10.000 CPM/Probe). Die Tabelle S. 35 zeigt die Ergebnisse mit und ohne organische Lösungsmittelrückstand, und in der Abbildung Nr.5 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt.

e) Einfluß der Lagerungszeit der Plasmaproben auf die Nachweisempfindlichkeit

Es soll untersucht werden, ob eine Zerstörung oder Änderung

der antigenen Eigenschaften von endogenem PG vermieden und damit größere Mengen im Assay nachgewiesen werden können wenn das Plasma ohne Zwischenlagerung bis zum Assay weiterverarbeitet wird.

Es werden Plasmaproben aus der 8. - 41. Schwangerschaftswoche untersucht. Das Blut wird nach Abnahme am gleichen Tag bis zur Inkubation (Punkt 6 der Anleitung) weiterverarbeitet und am nächsten Tag der Assay abgeschlossen. Die Tabelle auf Seite 38 und Zeichnung Nr. 5 zeigen die gewonnene Eichkurve zu diesem Assay.

Bei den Plasmaproben werden 0,8 ml von 1,3 ml zur Auswertung im Scintillationszähler in die Zählfläschchen gegeben. Die CPM-Gesamt errechnet sich dann wie folgt:

$$CPM_{gesamt} = (CPM - 60) \times 1{,}625$$

Einige der Proben werden doppelt bzw. dreifach untersucht.

f) Prüfung der Gesamt-Recovery

Hierzu werden in jeweils 1 ml Plasma einer Patientin (26 Jahre, klinische Diagnose: Sterilität) mit vermuteter niedriger Konzentration an endogenem PG-F, bekannte Konzentrationen (0,1 ml) von PG-F Standard gegeben, um nach dem Assay die wiedergefundene Konzentration mit der Eichkurve zu vergleichen. Diese Untersuchung gibt insbesondere Aufschluß darüber, ob bei den F-Prostaglandinen durch die Extraktion und Chromatographie die antigene Eigenschaft verändert wird.

g) Untersuchung größerer Plasmafraktionen zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit

Es werden Plasmaproben aus der 12. - 40. SSW wie bisher in 0,2 und 0,4 ml sowie zusätzlich in 1 ml Fraktionen untersucht. Der Assay wird bei einer Konzentration des $^{3}H\ PGF_{1\alpha}$ von 6 nCi/Probe = ca. 6000 CPM ausgeführt, die also wesentlich unter der empfohlenen Konzentration des Herstellers (10 nCi/Probe) liegt. Die damit ermittelte BK beträgt 50 %.

Die gezeigte Eichkurve ist wie die anderen Eichkurven mit einem Tracer von 10 nCi/Probe gewonnen worden, weshalb die in der Tabelle errechneten PG-Werte keine Absolutwerte darstellen, die niedriger liegen müßten. Ebensowenig ist bei diesen Ergebnissen der Wiederfindungstest mitberücksichtigt. Es soll vielmehr nur ein Vergleich der Nachweisempfindlichkeit zwischen den einzelnen Fraktionen ermöglicht werden (Berechnung von CPM_{Gesamt} siehe Punkt e).

3. Auswertung der Plasmaproben nach neuem Versuchsaufbau

Im Vergleich zu C. Punkt 1. werden folgende methodischen Teilschritte verändert:

a) Konzentration des Tracers: 0,06 µCi/ml (= ca. 6000 CMP/ Probe).

b) Doppelbestimmung der Plasmaproben (2 x 1 ml) ohne diese für den Assay in kleinere Fraktionen aufzuteilen.

c) Die Kontaktzeit für Holzkohle (Punkt 8 der Anleitung) wurde mit 5 min für alle Proben exakt eingehalten.

d) In die zur Gewinnung der Eichkurve benötigten Reagenzgläser wird vorher die gleiche Menge an Lösungsmittel eingefüllt und wieder abgedampft, welche auch zur Verarbeitung der Plasmaproben für Extraktion und Chromatographie benötigt wird. Damit sind bis auf nicht eliminierbare Plasmarückstände im Assay der Plasmaproben gleiche Bedingungen für den Assay der Plasmaproben und der Eichkurve gewährleistet.

III. E R G E B N I S S E

A. EXTRAKTION

Die Ergebnisse der Extraktion, gemessen an der Wiederfindungsrate des dem Plasma zugesetzten ^{3}H -$PGF_{1\alpha}$, zeigt untenstehende Tabelle. Die Gesamtaktivität ist diejenige Konzentration an markierten Prostaglandinen, die jeder Plasmaprobe vor der Extraktion zugesetzt wird. Zur Messung wird der Tracer direkt in ein Zählröhrchen mit Scintillationsflüssigkeit gegeben.

Gesamtaktivität CPM	Methode nach: D.O.v.ORDEN CPM	JAFFE 1974 CPM	AULETTA 1974 CPM
7683.3	3668.3	5017.3	7379.8
7675.1	3774.8	5047.6	7414.9
7680.3	5908.9	5442.4	6216.5
8118.2	6115.8	6099.5	7466.2
7699.2	6478.9	5672.4	7241.1
7252.6	5023.4	4962.8	7403.9
7905.3	5048.3	5312.6	7487.4
7819.0	5630.5		6834.1
7991.9	5814.3		7449.9
8231.7	5682.4		7335.0
7991.5			6361.7
7178.1			7447.5
			7276.6
			7387.1
			7695.4
n = 12	n = 10	n = 7	n = 15
$\frac{\Sigma}{n}$ = 7768.8	$\frac{\Sigma}{n}$ = 4738.9	$\frac{\Sigma}{n}$ = 5364	$\frac{\Sigma}{n}$ = 7226.4
= 100 %	= 60.99 %	= 69.05 %	= 93.01 %
	der Ausgangsaktivität	der Ausgangsaktivität	der Ausgangsaktivität

B. CHROMATOGRAPHIE

Die Plasmaproben werden extrahiert nach den Methoden von

A. VAN ORDEN 1973
B. JAFFE 1974

und zur Bestimmung der Wiederfindungsrate 0,1 ml $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ zu jeder Plasmaprobe gegeben. Die Ausgangsaktivität ist die Menge des zugesetzten Tracers, gemessen in CPM (Counts per minute). Die Angabe in Prozent ist die noch vorhandene Menge an $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ (gemessen in CPM) nach der Chromatographie. Die Wiederfindungsrate zeigt Ergebnisse in der gleichen Größenordnung (siehe Übersicht nächste Seite). In Anbetracht der geringen Anzahl von Versuchen ist keine Methode der anderen eindeutig überlegen.

Daß diese Zahlen kein Zufallsergebnis sind, konnte bei den nachfolgenden Versuchen gezeigt werden. Zur Kontrolle des Radioimmunoassay wurden immer Kontrollseren mitgeführt und die Wiederfindungsrate nach Extraktion, Chromatographie und Radioimmunoassay bestimmt.

EXTRAKTION	CHROMATOGRAPHIE				
A. 3 Plasma-proben + $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ (ca. 6516 CPM) (n. JAFFE)	a) n.JAFFE 1974: n = 2	F I =	78.8 CPM /	137.1 CPM =	1.65 %
		F II =	604.8 CPM /	671.9 CPM =	9.79 %
		F III =	4827.0 CPM /	5021.1 CPM =	75.56 %
					87.00 %
	b) n. VAN ORDEN: 1973 n = 1	F I =	960.1 CPM =	14.73 %	
		F II =	4291.3 CPM =	65.85 %	
				80.58 %	
B. 3 Plasma-proben + $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ (ca. 5790 CPM) (n. V.ORDEN)	a) n.JAFFE 1974: n = 1	F I =	65.7 CPM =	1.13 %	
		F II =	125.3 CPM =	2.17 %	
		F III =	5013.9 CPM =	86.50 %	
				89.80 %	
	b) n. VAN ORDEN: 1973 n = 2	F I =	179.4 CPM /	163.9 CPM =	2.96 %
		F II =	5387.2 CPM /	4942.3 CPM =	89.20 %
					92.16 %

Ergebnisse der Chromatographie

C. RADIOIMMUNOASSAY

1. Bestimmung von PG-F in Plasmaproben

Probe Nr.	SSW	CPM 0,2	% -Leerwert	CPM 0,4	% -Leerwert	PG 0,2 (pg)	PGges. x 5 x Rec. (pg)	PG 0,4 (pg)	PGes. x 2,5 x Rec. (pg)
151	12	4375	93,45	3242	68,91	33	141,40	125	267,81
207	12	4209	89,86	3808	81,17	47	201,39	78	167,11
187	12	4075	86,96	3846	82,00	56,5	242,10	75	160,68
165	16	3957	84,40	1851	38,79	64	274,24	-	-
133	16	3895	83,06	3763	80,20	70	299,95	80	171,40
233	16	1822	38,16	2048	43,05	-	-	-	-
138	16	4204	89,75	3524	75,02	48	205,68	100	214,25
112	20	4143	88,43	3916	83,51	51	218,53	69	147,83
116	20	4003	85,40	3734	79,57	62	265,67	83	177,82
157	20	4076	86,98	3694	78,70	56,2	242,10	86	184,25
175	20	4335	92,59	4127	88,08	36,5	156,40	48,5	103,91
170	24	3878	82,69	3830	81,65	71	304,23	76	162,83
197	24	4364	93,22	1898	39,80	35	149,97	-	-
232	24	4250	90,75	3859	82,28	44	188,54	73	156,40
5	28	1971	41,39	3514	74,81	-	-	100	214,25
169	28	3989	85,09	3793	80,85	62	265,67	79	169,25
274	28	4125	88,04	1679	35,06	53	227,10	-	-
27	32	3955	84,36	3650	77,75	66	282,81	90	192,82
32	32	4086	87,19	3707	78,99	56	239,96	85	182,11
37	32	4355	93,02	3901	83,19	35	149,97	70	149,97
196	32	4495	96,05	3869	82,49	23	98,55	73	156,40
213	32	4266	91,09	3918	83,56	45	192,82	68,5	146,76
11	36	1824	38,20	3813	81,28	-	-	76	162,83
195	36	4263	91,03	3699	78,81	45	192,82	85	182,11
220	36	3523	75,00	3218	68,39	100	428,50	128	274,24
258	36	3862	82,34	3857	82,23	73	312,80	74	158,54
243	36	4028	85,94	3738	79,66	60	257,10	82	175,68
46	40	4078	87,02	3823	81,50	56	239,96	76	162,83
127	40	3949	84,23	3926	83,73	64	274,24	68	145,69
136	40	4132	88,19	3861	82,32	52	222,82	73	156,40
150	40	4329	92,46	3822	81,48	38	162,83	77	164,97
281	40	1834	38,42	3479	74,05	-	-	104	222,82

Eichkurve zu C 1.

	500 pg	250 pg	125 pg	62,5 pg	31,25 pg	15,62 pg	7,81 pg	3,90 pg	0 pg
CPM (-Leerw.)	1291	1656	2023	2575	2903	3042	3021	3024	3045
%	42,39	54,38	66,43	84,56	95,33	99,90	99,21	99,31	100
CPM (-Leerw.)	1597	1988	2525	3035	3318	3359	3419	3496	3552
%	44,96	55,96	71,08	85,44	93,41	94,56	96,25	98,41	100
$\frac{CPM}{2}$	1444	1822	2274	2805	3110	3200	3220	3260	3298
x 1,4	2021	2250	3183	3927	4354	4480	4508	4564	4617
%	43,78	55,24	68,95	85,05	94,29	97,02	97,63	98,85	100

Bindungskapazität: 2760 CPM
3264 CPM

Mittelwert: 3012 CPM x 1,5 = 4518 CPM

10.000 CPM : BK = 45,18 %
=======

ergibt bei einer Gesamtkapazität von

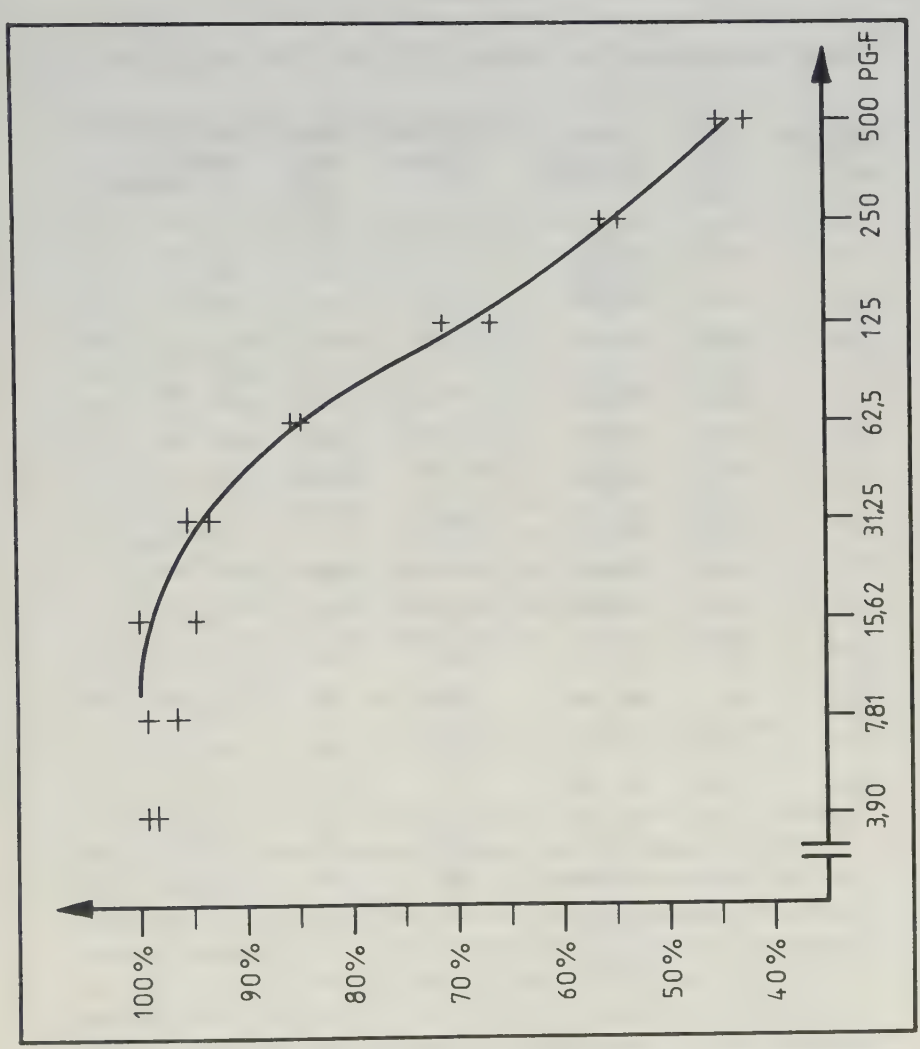


Abb.1: Eichkurve zu C 1.

Wiederfindungstest für ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$

Plasma-Probe Nr.	Rest-Aktivität (CPM)	Prozent d. Ausgangsaktivität	Plasma-Probe Nr.	Rest-Aktivität (CPM)	Prozent d. Ausgangsaktivität
151	168	92.92	27	152	84.070
201	92	50.88	32	163	90.154
187	149	82.41	37	154	85.176
165	159	87.94	196	70	38.716
133	165	91.26	213	143	79.092
233	170	94.026	11	155	85.730
138	153	84.62	195	138	76.327
112	149	82.41	220	158	87.389
116	148	81.858	258	148	81.813
157	154	85.176	243	165	91.216
175	161	89.048	46	160	88.495
170	135	74.668	127	102	56.415
232	155	85.730	136	147	81.305
5	138	76.327	150	124	68.584
169	141	77.986	281	141	77.986
274	153	84.623			
197	166	91.814			

Durchschnittswerte:

Ausgangsaktivität 452 CPM (Zählzeit 10 min)

Restaktivität nach der Chromatographie 155 CPM x 2,5 (es wurden nur 0,4 ml von 1 ml gezählt)

ergibt: 378.5 CPM = 85.7 %
======

2. Kontrollversuche zum Assay

a) Bestimmung der Bindungskapazität

Eichkurve

pg	CPM	%	CPM	%	CPM (Durchschn.)	%
1000	684	27,39	1143	40,51	913	34,35
500	1035	41,44	963	34,13	999	37,57
250	1220	48,85	1543	54,69	1381	51,95
125	1509	60,43	1723	61,07	1616	60,77
62,5	2161	86,54	1925	68,23	2043	76,83
31,25	2219	88,86	2269	80,43	2244	84,39
15,62	2334	93,47	2486	88,12	2410	90,63
7,81	2381	95,35	2398	85,00	2389	89,86
3,90	2298	92,03	2535	89,86	2416	90,88
0,0	2497	100,00	2821	100,00	2659	100,00

-AK: (145, 159, 156, 148) CPM

Die halblogarithmische graphische Darstellung der Eichkurve zeigt wie im vorhergehenden Assay gute Abhängigkeit zwischen den zugegebenen PG's und der Bildung des AG - AK - Komplexes. Differenzen bei Übereinanderprojektion der einzelnen Eichkurven in verschiedenen Assays sind zu verstehen als Variation des Antikörpers durch vom Untersucher nicht beeinflußbare Parameter wie Herstellungsqualität, Lagerungszeit etc. sowie Unterschiede in der Kontaktzeit des Reaktionsgemisches mit der Holzkohle (siehe S.32).

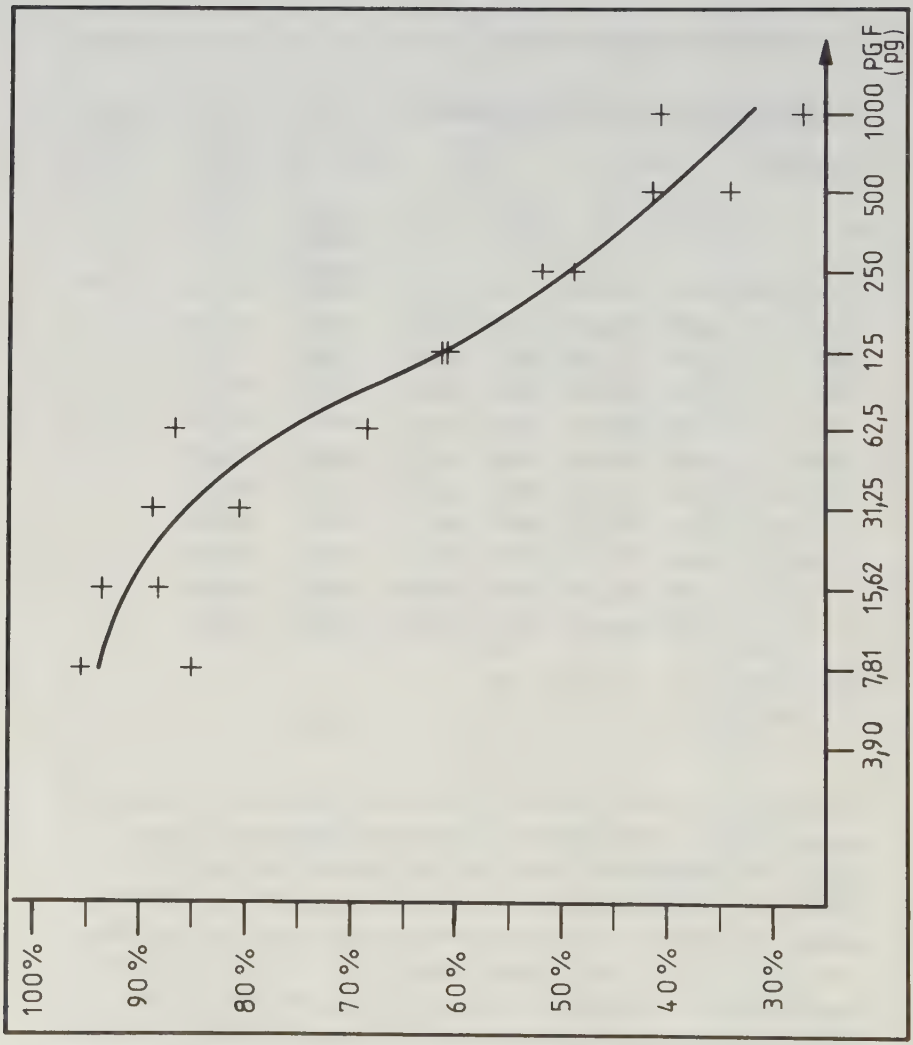


Abb.2: Eichkurve zu 2 a)

Bindungskapazität

1. BK mit organischem Lösungsmittelrückstand (0,1 ml Puffer, weiter mit Punkt 4 der Anleitung)

   CPM 2645 2667 2588
   2628 2688 2730
   2828 2795 2688

   $\frac{\sum n}{n}$ = 2695 x 1,4 = 37,73 %

2. BK ohne Lösungsmittelrückstand (0,1 ml Puffer, weiter mit Punkt 4 der Anleitung)

   CPM 2688 2733 2768
   2745 2618 2939
   2828 2795 2688

   $\frac{\sum n}{n}$ = 2755 x 1,4 = 38,58 %

3. BK mit organischem Lösungsmittelrückstand (0,1 ml Puffer + 0,2 ml AK, weiter mit Punkt 5 der Anleitung)

   CPM 3263 3450 3447

   $\frac{\sum n}{n}$ = 3386 x 1,4 = 47,41 %

4. BK ohne Lösungsmittelrückstand (0,1 ml Puffer + 0,2 ml AK, weiter mit Punkt 5 der Anleitung)

   CPM 3471 3574 3568

   $\frac{\sum n}{n}$ = 3537 x 1,4 = 49,52 %

   Rechenweg: 1 ml Überstand von 1,4 ml werden für den Scintillationszähler abgesaugt. Eingesetzte Aktivität von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ = 0,1 µCi/ml (entspricht ca. 10.000 CPM/0,1 ml)

5. BK mit verschiedenen Konzentrationen von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ mit organischem Lösungsmittelrückstand

		CPM	CPM	$\frac{\sum n}{n}$	
^{3}H PG-$F_{1\alpha}$	= ca.19.000 CPM:	3163	2918	3040 CPM	x 1,4=22,40%
"	= ca.14.000 CPM:	2916	3109	3012 "	x 1,4=30,12%
"	= ca. 7.400 CPM:	1804	2217	2010 "	x 1,4=38,03%
"	= ca. 6.000 CPM:	2240	1816	2028 "	x 1,4=47,32%

6. BK mit verschiedenen Konzentrationen von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ ohne Lösungsmittelrückstand

		CPM	CPM	$\frac{\Sigma n}{n}$	
^{3}H PG-$F_{1\alpha}$	= ca.19.000 CPM:	2855	3304	3079 CPM	x 1,4=22,69%
"	= ca.14.000 CPM:	2904	3139	3021 "	x 1,4=30,21%
"	= ca. 7.400 CPM:	2363	2314	2338 "	x 1,4=44,24%
"	= ca. 6.000 CPM:	2103	2118	2110 "	x 1,4=49,24%

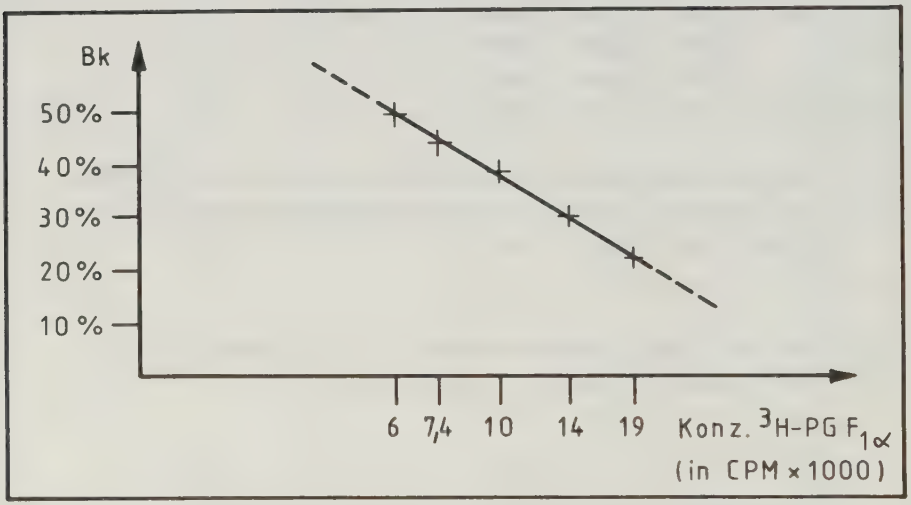


Abb.3: BK bei verschiedenen Konz. von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$

Während die BK im 1. Assay noch bei 45,18 % lag, ist in diesem Versuch eine erheblich geringere BK von 38,58 % nachzuweisen, und bei Bestimmung im organischen Lösungsmittelrückstand liegt die BK mit 37,73 % etwas tiefer. Die Beeinflussung des Antikörperbindungsvermögens durch diese Lösungsmittelrückstände ist deshalb als gering anzusehen. Jedoch beeindrucken die großen Unterschiede der BK im 1. und 2. Assay. Da die Versuchsbedingungen in beiden Fällen gleich sind, kann man unterschiedliche Eigenschaften des Antikörpers in seinem

Bindungsvermögen annehmen und sollte jedes RIA-Set vor Gebrauch neu einstellen.

Damit eine optimale BK von ca. 50 % für das Assay erreicht wird, sind bei diesem Antiserum entweder die Konzentration desselben zu verdoppeln (0,2 ml) oder die eingesetzte ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ in einer Konzentration von nur 6 nCi (ca. 6000 CPM) je Probe anzuwenden.

b) Absorption der Strahlung von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ durch Plasmarückstände (Q-Effekt)

1. Sauberes Reagenzglas

CPM 6589 6566 6501 6622 6467

$\frac{\sum n}{n}$ = 6549 x 1,375 = 90,04 % der zugesetzten Konzentration
======= ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$

2. Reagenzglas mit Extraktionsrückstand von 1 ml Puffer

CPM 6775 6586 6587 6741 6739

$\frac{\sum n}{n}$ = 6685 x 1,375 = 91,92 %
=======

3. Reagenzglas mit organischem Lösungsmittelrückstand

CPM 6640 6225 6711 6689 6605

$\frac{\sum n}{n}$ = 6574 x 1,375 = 90,39 %
=======

4. Reagenzglas mit Extraktionsrückstand von 1 ml Plasma

CPM 6468 6710 6685 6643 6737

$\frac{\sum n}{n}$ = 6648 x 1,375 = 91,41 %
=======

5. Reagenzglas mit Rückständen nach Extraktion und Chromatographie von 1 ml Puffer

CPM 6686 6711 6712 6802

$\frac{\sum n}{n}$ = 6727 x 1,375 = 92,50 %
=======

6. Reagenzglas mit Rückständen nach Extraktion und Chromatographie von 1 ml Plasma

CPM 6803 6681 6754 6958

$\frac{\sum n}{n}$ = 6799 x 1,375 = 93,48 %

c) Einfluß der Kontaktzeit der Holzkohle mit dem Reaktionsgemisch

Die Ergebnisse zeigen, daß bei zunehmender Kontaktzeit mehr ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ an die Holzkohle adsorbiert wird. Dies ist zum Teil freies nicht im AG-AK-Komplex gebundenes ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$, was man an der -AK-Kontrolle sehen kann. Sie nimmt von "0 min" bis "4 min" kontinuierlich ab. Zum anderen Teil wird aber auch das in dem AG-AK-Komplex vorliegende Antigen (^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ + PG-F Standard) wieder aus der Bindung gelöst (besonders bei höheren PG-F-Konzentrationen) und von der Holzkohle adsorbiert. Folglich werden bei längeren Kontaktzeiten geringere Mengen an PG nachgewiesen, und die Standardkurve nimmt einen mehr S-förmigen Verlauf an. Neben dem exakten Einhalten der Kontaktzeit mit Holzkohle in allen Proben und der zugehörigen Eichkurve ist es wichtig, die Eichkurve so zu reproduzieren, daß ein stabiler Bereich mit minimaler Änderung der Adsorptionsbereitschaft vorliegt und andererseits die Kontaktzeit, wegen des besseren Nachweises von PG, möglichst gering gehalten werden soll. Bei zunehmender Kontaktzeit werden immer weniger Antigene (^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ + PG-F Standard) von der Holzkohle adsorbiert, was die nächste Tabelle zeigen soll. Dabei wird kein PG-F Standard zu den Proben gegeben und nur ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ als Antigen verwendet. Das Assay wird wie oben beschrieben ausgeführt. Die Tabelle zeigt, daß ab etwa 6 min Kontaktzeit die Adsorption von ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$ an die Holzkohle nicht mehr zunimmt, also ein stabiler Bereich vorliegt. (Siehe Seite 35)

Eichkurven

pg	Kontaktzeit "0 sec"		Kontaktzeit "1 min"		Kontaktzeit "2 min"		Kontaktzeit "3 min"		Kontaktzeit "4 min"	
	CPM	%	CPM	%	CPM	%	CPM	%	CPM	%
1000	2335	64,84	1560	56,41	1300	52,12	1036	45,63		
500	2716	75,42	1660	60,03	1285	51,52	1255	55,28	1154	51,91
250	2399	66,62	1684	60,90	1473	59,06	1341	59,07	1190	53,53
125	3029	84,11	1936	70,01	1790	71,77	1531	67,44	1445	65,00
62,5	3238	89,91	2307	83,43	1964	78,74	1649	72,64	1895	85,24
31,25	3403	94,50	2533	91,60	2202	88,29	2082	91,71	2150	96,71
15,62	3597	99,88	2704	97,79	2335	93,62	2249	99,07	2062	92,75
7,81	3360	93,30	2700	97,64	2451	98,27	2297	100	2203	99,10
3,90	3624	100	2831	100	2449	98,19	2299	100	2279	100
1,95	3579	99,38	2848	100	2419	96,99	2162	95,24	2228	100
0	3601	100	2765	100	2494	100	2270	100	2223	100
- AK	920		801		540		490		383	

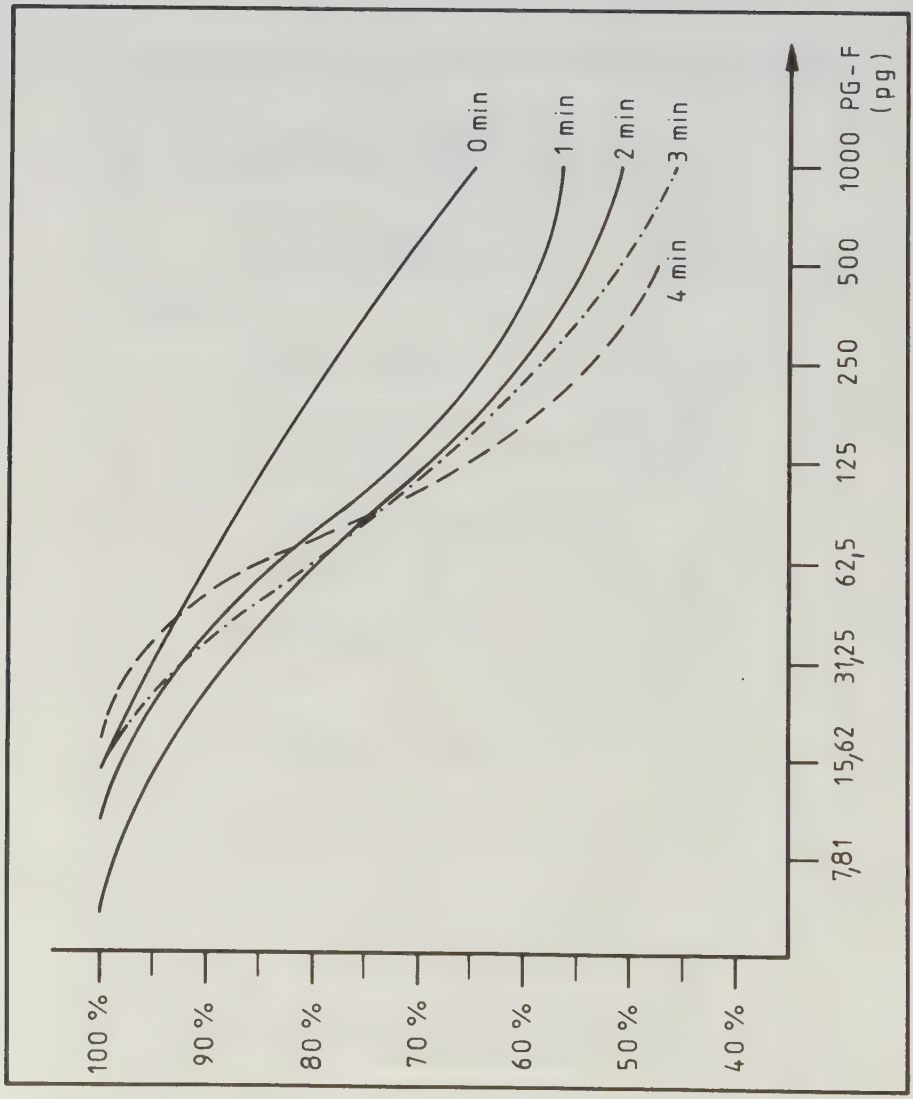


Abb. 4: Eichkurven bei versch. langer Kontaktzeit des Reaktionsgemisches mit Holzkohle

	0 min	1 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
CPM	4673	3842	3332	2986	2634	2575	2612
x 1,4	6542	5378	4664	4180	3687	3605	3656
% d.Ausg. Konz.v. ^{3}H PG-$F_{1\alpha}$	65,42%	53,78%	46,64%	41,80%	36,86%	36,05%	36,56%

	12 min	14 min	16 min	18 min	20 min
CPM	2424	2526	2509	2348	2532
x 1,4	3395	3536	3512	3287	3544
% d.Ausg.-Aktivität	33,95%	35,36%	35,12%	32,87%	35,44%

d) Empfindlichkeit des Antikörpers

a. Reagenzgläser ohne organischen Lösungsmittelrückstand

A_1 = Im Assay verwendete Antikörperkonzentration (0,1 ml)

Verdünnung	CPM	CPM	CPM	$\frac{\sum n}{n}$	BK
A_1 1	2677	3113	3257	3015 x 1,4 =	42,21 %
A_2 1: 2	1437	1456	1576	1456 x 1,4 =	20,38 %
A_3 1: 4	769	1022	990	927 x 1,4 =	12,97 %
A_4 1: 8	489	580	567	545 x 1,4 =	7,63 %
A_5 1: 16	306	382	282	323 x 1,4 =	4,52 %
A_6 1: 32	283	verworfen		283 x 1,4 =	3,96 %
A_7 1: 64	239	218	253	236 x 1,4 =	3,31 %
A_8 1:128	159	169	195	174 x 1,4 =	2,44 %

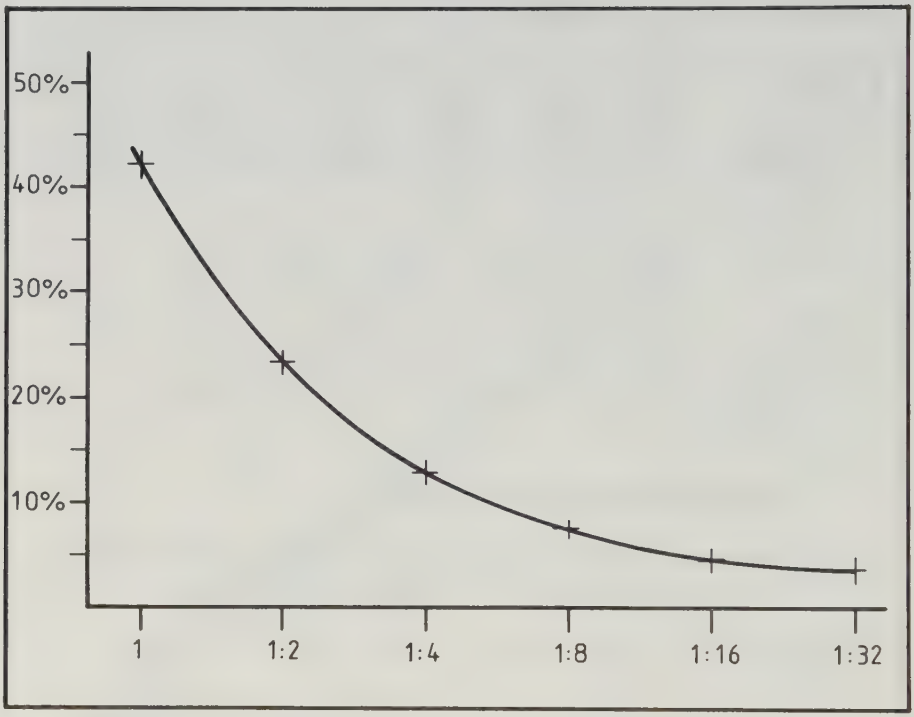


Abb.5: Empfindlichkeit (BK) des Antikörpers bei verschiedenen Verdünnungen (ohne org. Lösungsmittelrückstand)

b. Reagenzgläser mit organischem Lösungsmittelrückstand

Verdünnung	CPM	x 1,4 =	BK
A_1 1	2569	3596	= 35,96 %
A_2 1: 2	verworfen	-	-
A_3 1: 4	722	1010	= 10,10 %
A_4 1: 8	434	607	= 6,07 %
A_5 1: 16	298	417	= 4,17 %
A_6 1: 32	255	357	= 3,57 %
A_7 1: 64	217	303	= 3,03 %
A_8 1:128	200	280	= 2,80 %

e) Einfluß der Lagerungszeit der Plasmaproben auf die Nachweisempfindlichkeit

Eichkurve (dargestellt in Abb.6 Seite 40)

pg	CPM	CPM	$\frac{\Sigma n}{n}$	Leer-wert	x 1,75	%
1000	559	515	537	477	834	29,03
500	717	655	686	626	1095	38,10
250	820	810	815	755	1321	45,95
125	1009	1035	1022	962	1683	58,55
62,5	1389	1296	1342	1282	2244	78,05
31,25	1547	1553	1550	1490	2607	90,68
15,67	1651	1651	1651	1591	2784	96,83
7,91		1681	1681	1621	2836	98,66
3,90		1627	1627	1567	2742	95,37
0,00	1737	1669	1703	1643	2875	100,00

0,8 ml von 1,4 ml wurden zur Auswertung in die Zählfläschchen gegeben. -AK: 161 CPM, 160 CPM, 155 CPM.

Zu jeder untersuchten Plasmaprobe wird zusätzlich ein Wiederfindungstest getrennt für die Extraktion und Chromatographie mit $^{3}H\text{-}PGF_{1\alpha}$ durchgeführt (0,1 µCi/ml).

Gemessene Aktivität nach der Extraktion 5488 CPM n = 28

(0,8 ml von 1 ml) x 1,25 = 6860 CPM

= 72,21 % der Ausgangs-
======= aktivität

Gemessene Aktivität nach der Chromatographie (0,8 ml von 1 ml)

Fraktion I.:
164 CPM x 1,25 = 205 CPM
n = 28 = 2,16 %
======

Fraktion II.:
5328 CPM x 1,25 = 6660 CPM
n = 28 = 70,10 %
=======

Probe Nr.	SSW	CPM	CPM Ges.	%	CPM	CPM Ges.	%
1	7.	1767	2773	96,45	1791	2813	97,84
		1577	2466	85,77	1597	2498	86,88
2	8.	1794	2819	98,05	1683	2638	91,75
		1697	2661	92,55	1621	2537	88,24
3	12.	1807	2839	98,74	1767	2775	96,52
4	14.	1738	2727	94,85	1720	2699	93,87
5	19.	1872	2945	102,43	1687	2644	91,96
6	27.	1895	2983	103,75	1739	2729	94,92
7	30.	1733	2720	94,60	1920	3022	105,11
		1732	2719	94,57	1722	2701	93,94
		1739	2729	94,92	1759	2762	96,06
8	33.	1732	2717	94,50	1665	2608	90,71
		1443	2443	84,97	1040	1593	55,40
9	33.	1736	2724	94,74	1656	2593	90,19
10	39.	1791	2813	97,84	1739	2729	94,92
		1784	2803	97,49	1804	2834	98,57
11	39.	1954	3078	107,06	1650	2583	89,84
		1720	2699	93,87	1771	2781	96,73
12	39.	1727	2709	94,22	1702	2669	92,83
13	39.	1916	3016	104,90	1787	2806	97,60
14	39.	1652	2588	90,01	1709	2679	93,18
15	39.	1690	2649	92,13	1598	2499	86,92
16	40.	1882	2960	102,95	1725	2706	94,12
17	41.	1864	2932	101,98	1819	2859	99,44
18	41.	1699	2663	92,62	1757	2757	95,89
19	41.	1776	2788	96,97	1690	2649	92,13
20	41.	1548	2418	84,10	1325	2055	71,47
		1185	1828	63,58	1085	1666	57,94

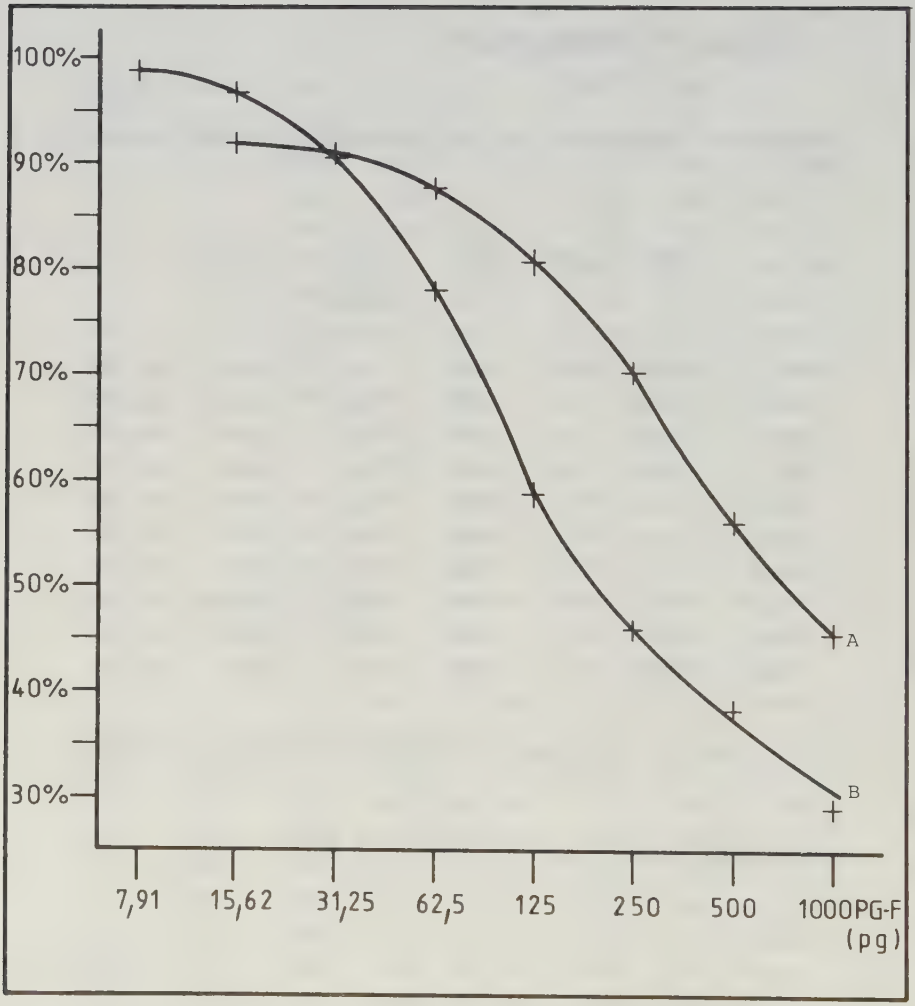
f) Prüfung der Gesamt-Recovery

Eichkurve - ausgeführt mit im Plasma enthaltenem Standard-PGF:

pg	CPM	CPM	$\frac{\sum n}{n}$	Leer-wert 60 CPM	x 1,625	%
1000	683	589	636	576	936	45,37
500	758	782	770	710	1153	55,92
250	839	911	875	815	1324	64,17
125	1098	1073	1085	1025	1666	80,77
62,5	1178	1173	1175	1115	1812	87,86
31,25	1155	1278	1216	1156	1879	91,09
15,67	1231	1239	1235	1175	1909	92,55
7,91	1423	1313	1368	1308	2125	103,02
3,90	1363	1327	1345	1285	2088	101,21
0,00	1346	1314	1330	1270	2063	100,00

0,8 ml von 1,3 ml werden im Scintillationszähler gemessen.

Graphische Darstellung der Eichkurve auf S. 40



Eichkurve A: ausgeführt mit bekannten Mengen Standard-PG-F im Plasma

Eichkurve B: Eichkurve zu 2 e)

Abb.6

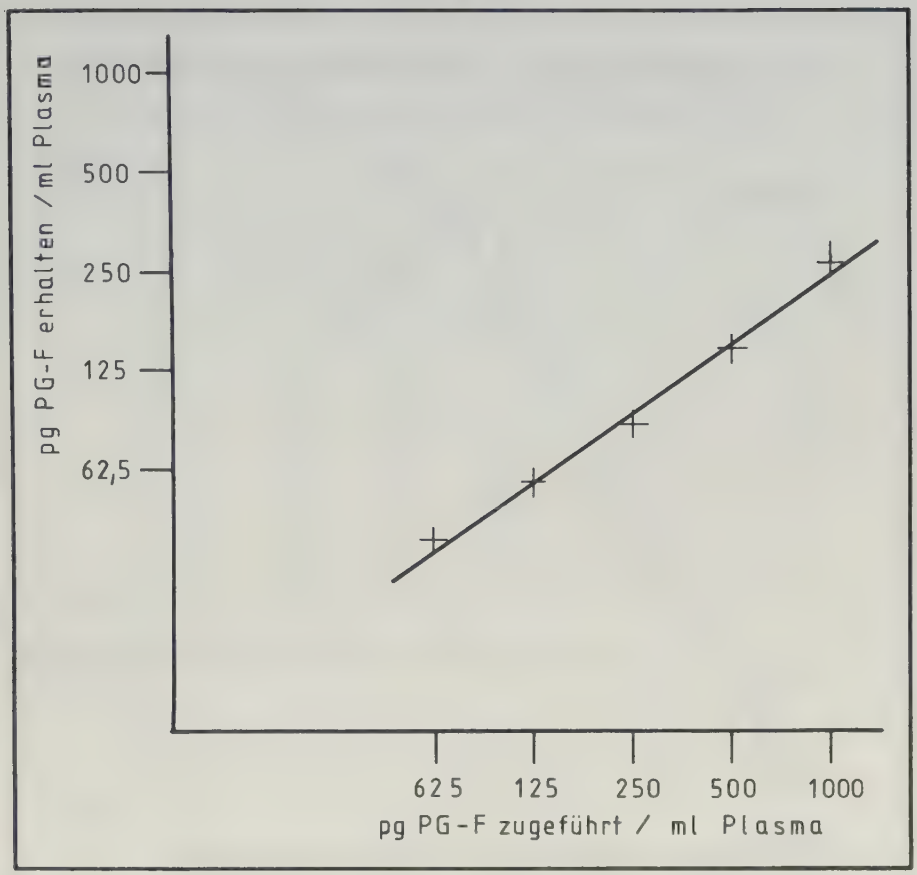


Abb.7: Verhältnis von wiedergefundenem PG-F aus dem Plasma nach dem Assay, zu der dem Plasma zugesetzten Menge an PG-F vor dem Assay.

g) Untersuchung größerer Plasmafraktionen zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit

Eichkurve

pg	CPM	CPM	$\frac{\Sigma n}{n}$	Leer-wert (55 CPM)	x 1,4	%
500	639	702	670	615	861	32,66
250	931	900	915	860	1204	45,66
125	1215	1237	1226	1171	1639	62,13
62,5	1562	1516	1539	1484	2077	78,74
31,25	1745	1737	1741	1686	2360	89,46
15,62	1914	1827	1870	1815	2541	96,33
7,81	1867	1811	1839	1784	2497	94,66
0,00	1924	1955	1939	1884	2638	100,00

1 ml von 1,4 ml werden nach dem Assay im Scintillationszähler gemessen: 55 CPM.

Ausgangsaktivität des Tracers:

6180 CPM
6345 CPM $\frac{\text{CPM}}{n}$ = 6344 CPM
6509 CPM
-Leer-wert = 6289 CPM
=========

Kontrolle ohne AK: 224 CPM
- Leerwert: 169 CPM
= 2,68 %
======

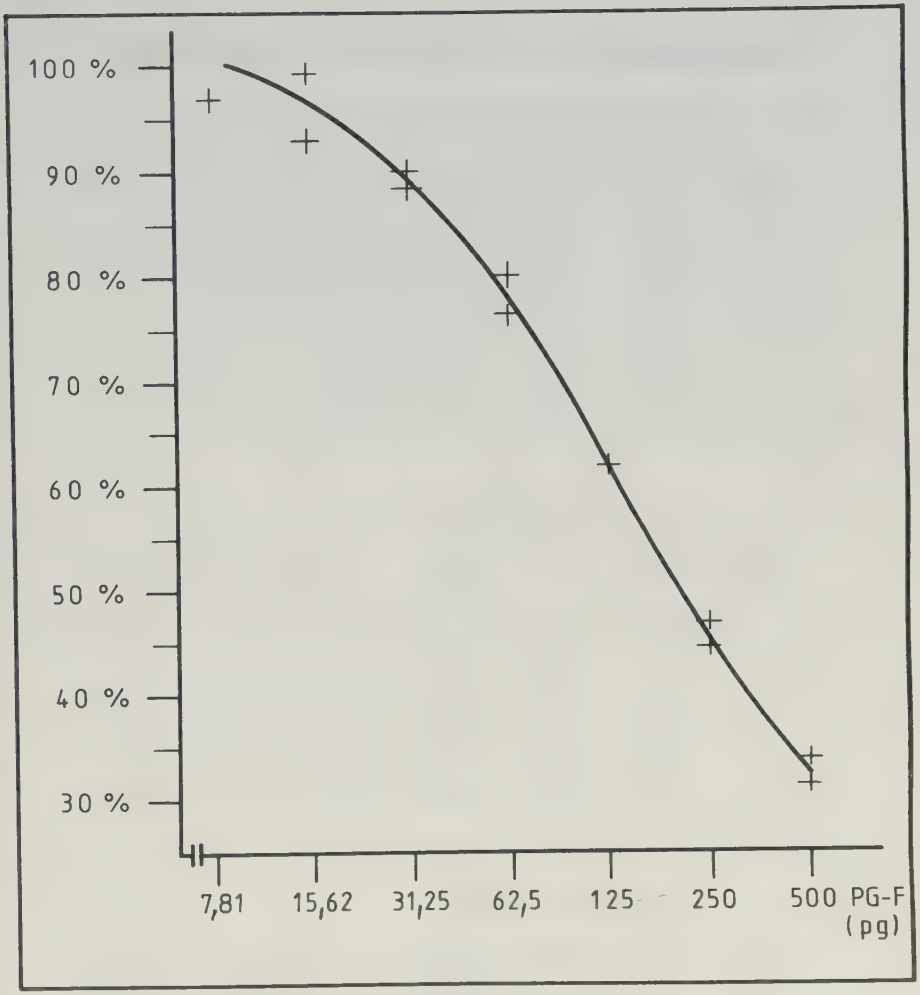


Abb.8: Eichkurve zu 2 g)
(für jeden CPM-Wert wurde der %-Wert errechnet und graphisch dargestellt)

Plasmaproben

- 1 ml Fraktion

Probe Nr.	SSW	CPM	CPM Ges.	%	PG (pg)
1	16	1287	1601	60,71	130
2	20	1234	1532	58,10	145
3	29	1157	1432	54,30	165
4	32	1078	1329	50,41	200
5	36	1228	1524	57,80	148
6	40	939	1149	43,56	275

- 0,2 ml Fraktion

Probe Nr.	SSW	CPM	CPM Ges.	%	PG (pg)	x 4
1	16	1743	2194	83,18	48	192
2	20	1755	2210	83,77	46	184
3	29	1830	2307	87,47	35	140
4	32	1707	2147	81,41	52,5	210
5	36	1802	2271	86,09	39	156
6	40	1558	1953	74,06	76	304

- 0,4 ml Fraktion

Probe Nr.	SSW	CPM	CPM Ges.	%	PG (pg)	x 2,5
1	16	1674	2104	79,78	57,5	143,75
2	20	1651	2074	78,65	61	152,50
3	29	1661	2087	79,14	60	150
4	32	1550	1943	73,67	77	192,5
5	36	1553	1947	73,82	77	192,5
6	40	1260	1566	59,38	138	345

3. Auswertung der Plasmaproben nach neuem Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau berücksichtigt die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche, und es sind zur statistischen Auswertung eine große Anzahl Plasmaproben untersucht worden.

Jede Plasmaprobe wird doppelt untersucht und für den Assay nicht in kleinere Fraktionen aufgeteilt, also der Assay mit 2 x 1 ml ausgeführt. Die PG-Werte in der vorletzten Spalte wurden durch die entsprechenden Prozentwerte in der Eichkurve A abgelesen (Auswertung bis 95 %). Bei einer Wiederfindungsrate von im Durchschnitt 80 % sind im PG-Gesamt die ermittelten Konzentrationen von PG noch mit 1,25 multipliziert worden.

A. Eichkurve zu C 3.: ausgeführt im Reagenzglas mit Lösungsmittelrückstand

PG (pg)	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	0,0
A: CPM	567	567	803	1185	1471	1688	1794	1796	1771
B: CPM	511	678	867	1153	1445	1671	1708	1874	1943
$\frac{A+B\ (CPM)}{2}$	539	637	835	1169	1458	1679	1751	1835	1857
abzügl. Leerwert	482	580	778	1112	1401	1622	1694	1778	1800
x 1,4	674	812	1089	1556	1961	2271	2371	2489	2520
% Gesamt	26,77	32,25	43,22	61,77	77,83	90,13	94,11	98,77	100
A %	28,33	30,00	41,44	62,66	78,55	90,61	96,50	96,61	
B %	25,22	34,50	45,00	60,88	77,11	89,66	91,72	100,94	

Ausgangsaktivität gemessen in CPM: 6151, 6297, 6079, 6322, 6467, 6206

$$\frac{\Sigma\ CPM}{6} = 6196\ CPM$$

Kontrollprobe ohne Antikörper: (149, 141, 136, 142, 140) CPM = $\frac{84,6}{61,96}$ = 1,36 %

Bindungskapazität: (2114, 2240, 2214, 2210, 2261) CPM

$$\frac{\Sigma\ CPM}{5} = 2207 \times 1,4 = 3090 = 49,88\ \%$$

B. Eichkurve zu C 3.: nach Lösung der Standardmengen PG-F in 1 ml Puffer und Extrahieren und Chromatographieren dieses Ansatzes (gleiche Behandlung der Standardmengen wie der Plasmaproben).

PG (pg)	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,91	0,0
CPM	431	692	954	1223	1463	1567	1682	1565	1496	1779
CPM	486	703	962	1254	1411	1501	1578	1553	1683	1958
$\frac{\text{CPM}}{2}$	458	697	958	1238	1437	1534	1630	1559	1589	1818
-Leerw.	401	640	901	1181	1380	1477	1573	1502	1532	1761
x 1,4	562	896	1261	1654	1932	2067	2202	2102	2145	2466
% Ges.	22,97	36,36	51,14	67,07	78,34	83,84	89,29	85,26	86,99	100

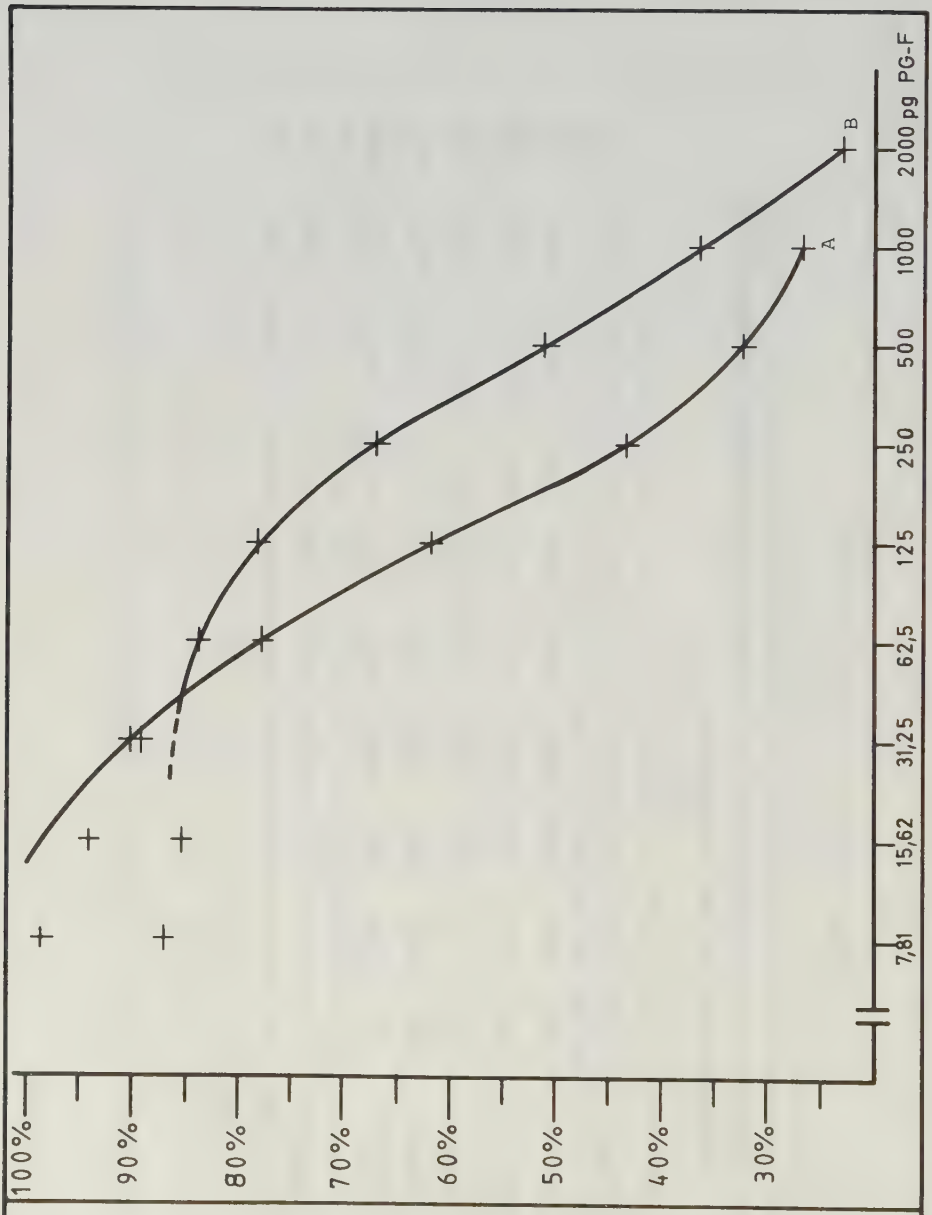


Abb. 9: Eichkurven zu C 3.

12. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
65	1406	1308	1357	1300	1820	72,22	81	101,25
186	1526	1983	1754	1697	2376	94,30	2,25	2,81
87	1945	1844	1894	1837	2572	102,08	-	-
208	2171	2110	2140	2083	2916	115,75	-	-
187	1729	1167	1448	1391	1947	77,27	64,00	80,00
244	1151	1563	1357	1300	1820	72,22	81	101,25
224	1250	1146	1198	1141	1597	63,38	116	145
234	2017	1949	1983	1926	2696	107,00	-	-
265	1668	1694	1681	1624	2273	90,22	31	38,75
207	1714	1674	1694	1637	2291	90,94	29	36,25
67	1033	1048	1040	983	1376	54,63	155	193,75
151	1451	1583	1517	1460	2044	81,11	53	66,25

16. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
186	1983	1526	1754	1697	2376	94,30	23	28,75
63	1156	1248	1202	1145	1603	63,61	115	143,75
235	1785	1804	1794	1737	2432	96,52	-	-
158	1050	1047	1048	991	1388	55,08	153	191,25
233	1585	1580	1582	1525	2135	84,75	46	57,5
319	1514	1605	1559	1502	2103	83,47	45,5	56,87
45	1537	1664	1600	1543	2160	85,75	40,5	50,62
270	1742	1627	1684	1627	2278	90,41	30	37,5
273	1886	1822	1854	1797	2515	99,83	-	-
98	1477	1592	1534	1477	2068	82,08	50	62,5
77	1437	1353	1395	1338	1873	74,33	72,5	90,62
117	1636	1511	1573	1516	2123	84,25	45	56,25
334	1829	1703	1766	1709	2392	94,94	21	26,25
68	1781	1556	1668	1611	2256	89,52	32	40
138	1215	1157	1186	1129	1580	62,72	119	148,75
223	1747	1353	1550	1493	2090	82,94	48	60
330	1947	1926	1936	1879	2631	104,41	-	-
40	1495	1616	1555	1498	2097	83,25	47	58,75

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
165	1465	2467	1966	1909	2672	106,05	-	-
346	2007	1814	1910	1853	2594	102,97	-	-
241	2165	2265	2215	2158	3021	119,88	-	-
34	1576	1416	1496	1439	2014	79,94	56	70
30	1488	1627	1557	1500	2100	83,36	46,5	58,12
310	1857	1846	1851	1794	2512	99,69	-	-
212	1184	1173	1178	1121	1570	62,30	120	150
209	1867	1863	1865	1808	2531	100,44	-	-
167	1341	990	1165	1108	1551	61,58	125	156,25

20. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
175	1335	1429	1382	1325	1855	73,61	76	95
293	2039	2006	2022	1965	2751	109,19	-	-
157	1356	970	1163	1106	1548	61,44	125	156,25
324	2067	1913	1990	1933	2706	107,38	-	-
204	1895	1842	1868	1811	2536	100,63	-	-
78	1754	1209	1481	1424	1994	79,13	58	72,5
205	1935	1869	1902	1845	2583	102,50	-	-
260	1838	1796	1817	1760	2464	97,77	-	-
314	1852	1847	1849	1792	2509	99,58	-	-
276	1846	1365	1605	1548	2167	86,02	40	50
1	1252	1386	1319	1262	1766	70,11	89	111,25
256	1246	1149	1197	1140	1596	63,36	117	146,25
341	2130	1522	1826	1769	2476	98,27	-	-
250	1285	1669	1477	1420	1988	78,88	59	73,75
116	1118	1031	1074	1017	1424	56,52	145	181,25
259	1860	1842	1851	1794	2511	99,66	-	-
228	1753	1908	1830	1773	2482	98,52	-	-
255	1895	1899	1897	1840	2576	102,22	-	-
254	1874	1829	1851	1794	2512	99,69	-	-
299	1576	1692	1634	1577	2207	87,61	36,5	45,62
108	1401	1455	1428	1371	1919	76,16	68	85
231	1635	1477	1556	1499	2098	83,27	47	58,75

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
323	1913	1968	1940	1883	2636	104,63	-	-
112	1397	1316	1356	1299	1819	72,19	82	102,5
214	1910	1846	1878	1821	2549	101,16	-	-
198	1063	1023	1043	986	1380	54,77	155	193,75
36	1305	1428	1366	1309	1833	72,75	79	98,75
342	1892	2007	1949	1892	2649	105,13	-	-

24. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
286	2258	2272	2265	2208	3091	122,66	-	-
297	2158	2127	2142	2085	2919	115,86	-	-
272	1703	1795	1749	1692	2368	94,00	23	28,75
360	1798	1596	1697	1640	2296	91,11	29	36,25
316	1869	1844	1856	1799	2519	99,97	-	-
218	2297	2125	2211	2154	3015	119,66	-	-
313	1807	1820	1813	1756	2459	97,58	-	-
355	1850	1903	1876	1819	2547	101,08	-	-
35	1394	1090	1242	1185	1659	65,83	105	131,25
149	1440	1373	1406	1349	1889	74,97	71	88,75
343	1202	1181	1191	1134	1588	63,02	118	147,5
340	1371	1970	1670	1613	2258	89,63	32	40
338	1717	1810	1763	1706	2389	94,80	21,5	26,87
336	1311	1870	1590	1533	2146	85,19	42	52,5
332	1704	1789	1746	1689	2365	93,86	23	28,75
249	1911	1407	1659	1602	2242	89,00	33	41,25
253	2005	1956	1980	1923	2692	106,86	-	-
320	1713	1660	1686	1629	2281	90,52	30	37,5
170	1678	1857	1767	1710	2394	95,02	-	-
188	1285	1518	1401	1344	1882	74,69	72	90

28. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
2	1507	1519	1513	1456	2038	80,88	53	66,25
3	1535	1546	1540	1483	2076	82,41	49	61,25
4	1601	1544	1572	1515	2121	84,19	45	56,25
5	1037	907	969	912	1276	50,66	185	231,25
6	1082	1411	1246	1189	1665	66,08	105	131,25
29	1267	1068	1167	1110	1554	61,69	124	155,0
162	979	919	949	892	1248	49,55	192	240
169	1436	969	1202	1145	1603	63,63	115	143,75
301	2003	2023	2013	1956	2738	108,66	-	-
351	1763	1764	1763	1706	2389	94,80	21,5	26,87
359	1358	1099	1228	1171	1640	65,08	110	137,5
357	1790	1745	1767	1710	2394	95,02	-	-
317	1909	1973	1941	1884	2637	104,66	-	-
126	1529	1423	1476	1419	1986	78,83	59	73,75
291	1821	1836	1828	1771	2480	98,41	-	-
147	1604	1492	1548	1491	2087	82,83	48	60
339	1868	1759	1813	1756	2459	97,58	-	-
327	2010	2039	2024	1967	2754	109,30	-	-
304	1346	1403	1374	1317	1844	73,19	78	97,5
303	2085	2534	2309	2252	3153	125,13	-	-

32. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
240	1455	1489	1472	1415	1981	78,61	60	75
226	1560	1671	1615	1558	2181	86,58	39	48,75
196	1238	997	1117	1060	1484	58,91	133	166,25
190	1827	1770	1798	1741	2438	96,75	-	-
185	1779	1688	1733	1676	2347	93,13	24,8	31
139	1120	947	1033	976	1367	54,25	158	197,5
131	1569	1344	1456	1399	1959	77,75	62	77,5
366	1738	1915	1826	1769	2477	98,30	-	-
365	1949	2180	2064	2007	2810	111,52	-	-
361	1912	1915	1913	1856	2599	103,13	-	-

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
358	1774	1711	1742	1685	2359	93,63	23,7	29,62
125	1021	973	997	940	1316	52,22	172	215
262	1532	1496	1514	1457	2039	80,94	53	66,25
164	852	1195	1023	966	1353	53,69	161	201,25
137	1411	1456	1433	1376	1927	76,47	66	82,5
88	1407	1418	1412	1355	1897	75,30	70	87,5
41	1703	1726	1714	1657	2320	92,08	27	33,75
70	1388	1428	1408	1351	1891	75,05	71	88,75
39	1872	1823	1847	1790	2506	99,47	-	-
199	1134	1093	1113	1056	1479	58,69	136	170
172	1063	809	936	879	1230	48,83	198	247,5
192	1650	1692	1671	1614	2259	89,66	32	40
84	1705	1682	1693	1636	2291	90,91	29	36,25
27	1560	1629	1594	1537	2152	85,41	41,5	51,87

36. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
8	1658	1584	1621	1564	2189	86,88	38	47,5
114	1420	1647	1533	1476	2067	82,02	50	62,5
128	1304	1331	1317	1260	1764	70,02	89	111,25
130	931	969	950	893	1250	49,61	192	240
132	1687	1474	1580	1523	2132	84,63	43,5	54,37
146	1314	1260	1287	1230	1722	68,33	96	120
171	1568	1556	1562	1505	2107	83,61	46	57,5
174	1507	1704	1605	1548	2167	86,02	40	50
191	1804	1886	1845	1788	2503	99,33	-	-
195	1835	1905	1870	1813	2538	100,72	-	-
200	1177	1259	1218	1161	1625	64,50	112	140
206	1704	1680	1692	1635	2289	90,83	29	36,25
211	1633	1921	1777	1720	2408	95,55	-	-
225	1627	1694	1660	1603	2244	89,08	33	41,25
227	1772	1771	1771	1714	2400	95,25	-	-
229	1648	1672	1660	1603	2244	89,05	33	41,25
230	1309	1646	1477	1420	1988	78,91	59	73,75
236	1415	1115	1265	1208	1691	67,11	100	125

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
238	1103	1157	1130	1073	1502	59,61	130	162,5
243	2114	1902	2008	1951	2731	108,38	-	-
251	1745	1657	1701	1644	2301	91,33	28	35
252	1073	1490	1281	1224	1714	68,02	97	121,25
257	1447	1613	1530	1473	2062	81,83	51	63,75
279	1546	1685	1615	1558	2181	86,58	39	48,75
287	1705	1568	1636	1579	2211	87,75	36	45
290	2010	1856	1933	1876	2626	104,22	-	-
305	1875	1931	1903	1846	2584	102,55	-	-
312	1478	1534	1506	1449	2028	80,50	54	67,5

40. SSW

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
280	1844	1508	1676	1619	2266	89,94	31	38,75
267	973	1570	1271	1214	1700	67,44	100	125
263	1449	1153	1301	1244	1741	69,11	93	116,25
307	1862	1339	1600	1543	2160	85,75	41	51,25
173	1318	1206	1262	1205	1687	66,94	102	127,5
288	1862	1903	1882	1825	2555	101,41	-	-
289	2139	2207	2173	2116	2962	117,55	-	-
281	1910	1843	1876	1819	2547	101,08	-	-
282	1452	2057	1754	1697	2376	94,30	22,5	28,12
284	1818	1811	1814	1757	2460	97,63	-	-
239	1063	1023	1043	986	1380	54,77	155	193,75
264	1505	1623	1564	1507	2109	83,72	46	57,5
182	1256	782	1019	962	1346	53,44	162	202,5
183	1118	1142	1130	1073	1502	59,61	130	162,5
184	1304	1231	1267	1210	1694	67,25	100	125
193	1535	1174	1354	1297	1816	72,08	82	102,5
194	1100	1060	1080	1023	1432	56,83	143	178,75
136	1513	1605	1559	1502	2102	83,44	46,5	58,12
155	1598	1428	1513	1456	2038	80,88	53	66,25
176	1850	1765	1807	1750	2450	97,25	-	-
127	1817	1437	1627	1570	2198	87,22	37,5	46,87

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
74	1362	1256	1309	1252	1752	69,55	91	113,75
86	1300	1507	1403	1346	1885	74,80	72	90
59	1320	1394	1357	1300	1820	72,22	81	101,25

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
13.SSW								
60	1503	1338	1420	1363	1908	75,75	69	86,25
18.SSW								
345	1975	1818	1896	1839	2575	102,19	-	-
19.SSW								
356	1923	1339	1631	1574	2203	87,44	37	46,25
309	1617	1939	1778	1721	2409	95,61	-	-
298	2073	1326	1699	1642	2299	91,25	28,5	35,62
348	2098	2153	2125	2068	2895	114,91	-	-
21.SSW								
331	1958	1667	1812	1755	2457	97,52	-	-
329	1763	1770	1766	1709	2393	94,97	21	26,25
362	1926	2101	2013	1956	2739	108,69	-	-
22.SSW								
215	2062	2006	2034	1977	2767	109,83	-	-
23.SSW								
353	1802	1750	1776	1719	2406	95,50	-	-
352	2124	2069	2096	2039	2855	113,30	-	-
325	1786	1667	1726	1669	2337	92,75	25,5	31,87
25.SSW								
354	1887	2025	1956	1899	2658	105,50	-	-
350	1665	1769	1717	1660	2324	92,22	26,5	33,12
275	1893	1554	1723	1666	2333	92,58	26	32,50
337	1938	2014	1976	1919	2686	106,61	-	-
333	1824	1816	1820	1763	2468	97,94	-	-
326	1552	2023	1787	1730	2422	96,13	-	-
27.SSW								
349	1976	1911	1943	1886	2641	104,80	-	-
322	1960	1828	1894	1837	2571	102,05	-	-

Probe Nr.	CPM	CPM	CPM / 2	abzgl. Leerw.	x 1,4	%	PG	PG ges.
29.SSW								
344	1364	1295	1329	1272	1781	70,69	86	107,50
364	1892	1894	1893	1836	2570	102,00	-	-
292	2071	1447	1759	1702	2382	94,55	22	27,50
328	1592	1954	1773	1716	2402	95,33	-	-
31.SSW								
300	2131	2069	2100	2043	2860	113,50	-	-
347	1853	1369	1611	1554	2175	86,33	39	48,75
33.SSW								
363	1865	1946	1905	1848	2587	102,69	-	-
294	2148	2033	2090	2033	2846	112,97	-	-
38.SSW								
302	1636	1654	1645	1588	2223	88,22	35	43,75

Den Mittelwert der errechneten Prozentwerte in den einzelnen SSW zeigt die Tabelle auf der nächsten Seite. Die Auswertung erfolgt sowohl für alle untersuchten Plasmaproben, als auch nur für Proben bis 100, 95 und 90 Prozent mit der Eichkurve A. Die Zeichnung Nr.10 zeigt diese Ergebnisse in graphischer Darstellung. Abbildung Nr.11 zeigt die gleichen Ergebnisse nach Ablesung der PG-Konzentrationen in der Eichkurve A.

Auswertung bis	90%	95%	100%	Gesamt
12. SSW	70,13%	77,63%	77,63%	85,09%
Anzahl d.Proben/nicht berücksichtigte Proben	(6) / (6)	(9) / (3)	(9) / (3)	(12) / (-)
Konz. PG-F	90 pg	63 pg	63 pg	42,5 pg
16. SSW	76,18%	78,87%	81,57%	85,48%
	(16)/(11)	(19)/ (8)	(22)/ (5)	(27) / (-)
	69 pg	60 pg	52 pg	41,5 pg
20. SSW	72,55%	72,55%	80,46%	86,55%
	(14)/(14)	(14)/(14)	(20)/ (8)	(28) / (-)
	81 pg	81 pg	55 pg	39 pg
24. SSW	78,68%	84,58%	87,17%	93,68%
	(7) /(13)	(12)/ (8)	(15)/ (4)	(20) / (-)
	60 pg	44 pg	37,5 pg	22,5 pg
28. SSW	69,91%	71,83%	76,55%	83,01%
	(12)/ (8)	(13)/ (7)	(16)/ (4)	(20) / (-)
	90 pg	83 pg	67,5 pg	48 pg
32. SSW	70,15%	74,84%	78,02%	80,46%
	(15)/ (9)	(19)/ (5)	(22)/ (2)	(24) / (-)
	90 pg	73 pg	62 pg	55 pg
36. SSW	78,10%	79,34%	81,49%	84,00%
	(19)/ (9)	(21)/ (7)	(24)/ (4)	(28) / (-)
	62 pg	58 pg	52 pg	45 pg
40. SSW	70,85%	72,02%	74,40%	79,01%
	(19)/ (6)	(20)/ (5)	(22)/ (3)	(25) / (-)
	87,5 pg	83 pg	75 pg	59,5 pg

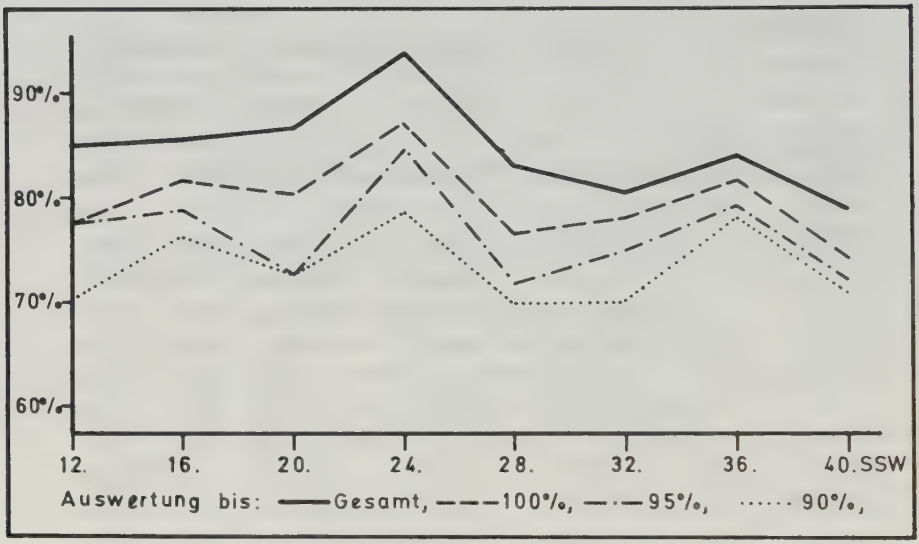

90%
80%
70%
60%
12.
16.
20.
24.
28.
32.
36.
40.SSW
Auswertung bis: Gesamt, 100%, 95%, 90%,

Abb. 10

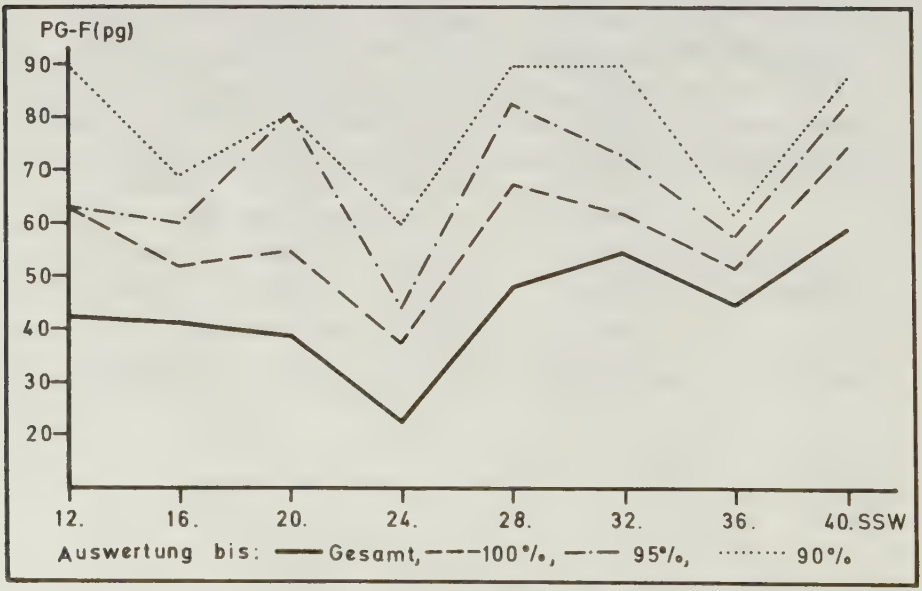

PG-F(pg)
90
80
70
60
50
40
30
20
12.
16.
20.
24.
28.
32.
36.
40.SSW
Auswertung bis: Gesamt, 100%, 95%, 90%

Abb. 11

Legt man zur Auswertung der Plasmaproben die Eichkurve B zugrunde, bei der die bekannten Standardmengen PG-F so verarbeitet wurden wie die Plasmaproben, erhält man höhere PG-F Konzentrationen als mit der Eichkurve A. Durch die gleichen Bedingungen des Verfahrens, die sowohl bei der Erstellung der Eichkurve als auch bei der Auswertung der Plasmaproben angewandt wurden, entsprechen die so ermittelten Plasmakonzentrationen am ehesten den tatsächlich vorhandenen Konzentrationen. Die Wiederfindungsrate (bei verschiedenen PG-F Konzentrationen unterschiedlich) sowie die Veränderung der Bindungsfähigkeit des AK durch Plasmarückstände finden bei dieser Auswertung folglich keine Berücksichtigung. Die Ergebnisse bei Auswertung der Plasmaproben der Verlaufsbeobachtung mit der Eichkurve B zeigt die Abb.12. Die ermittelten PG-F Konzentrationen liegt zwischen 48 pg und 109 pg. Die Kurve in ihrem Verlauf, jedoch nicht in der Angabe der Konzentrationen, ist identisch mit der entsprechenden Kurve in Abb.11.

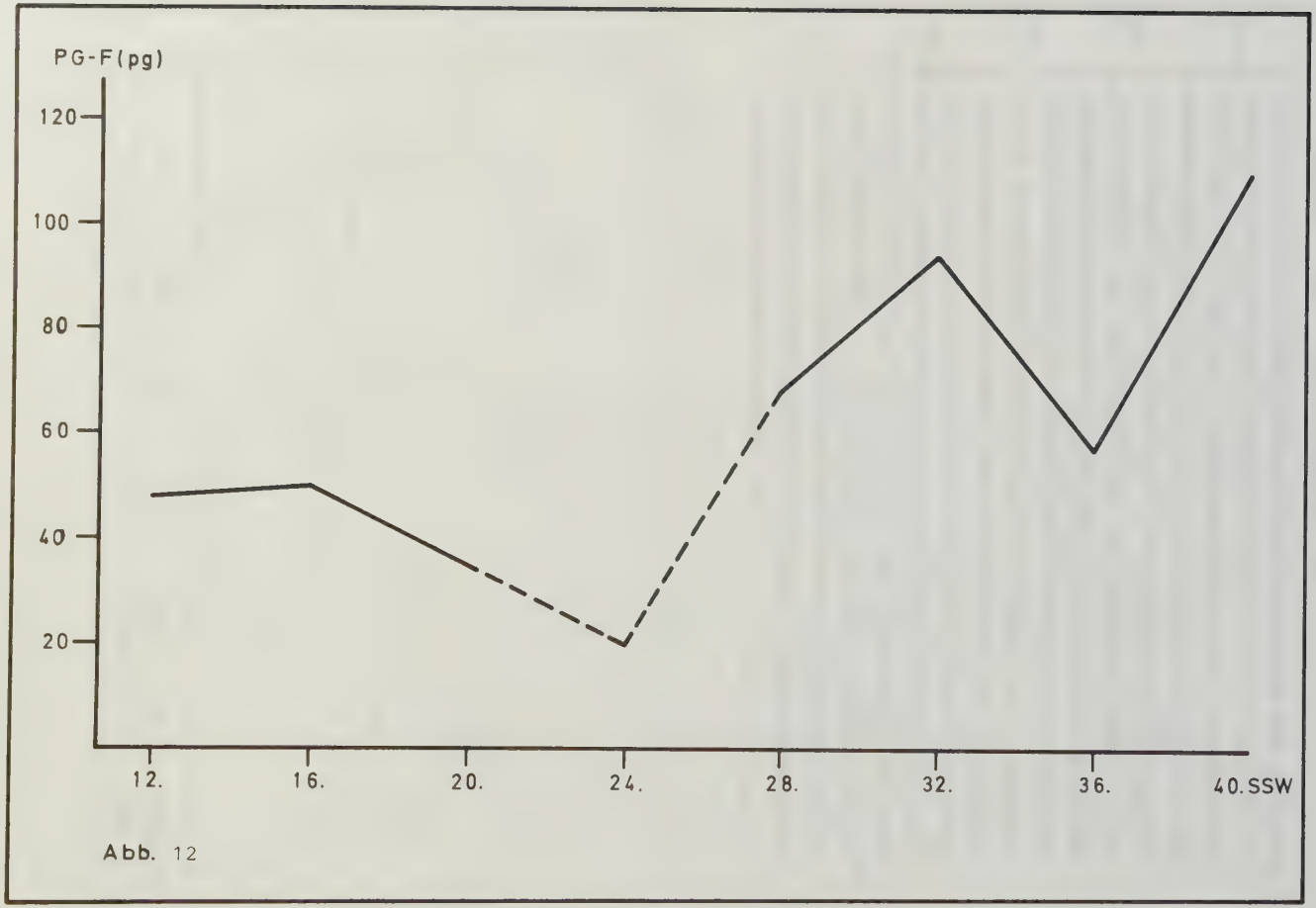


Abb. 12

IV. D I S K U S S I O N

Für den Nachweis von Prostaglandinen aus dem Plasma bietet sich wegen der hohen Nachweisempfindlichkeit der Radioimmunoassay an. Da derzeit noch keine standardisierte Routinemethode zur Verfügung steht, mußten die Angaben einiger Autoren durch Vorversuche in unserem Labor auf ihre Effizienz überprüft werden, gemessen an der Wiederfindungsrate von zugesetzten radioaktivmarkierten Prostaglandinen.

Für die Extraktion wurden die Methoden nach AULETTA (1973), VAN ORDEN (1973) und JAFFE (1974) durchgeführt, um sie hinsichtlich ihrer Effizienz miteinander zu vergleichen. Mit einer Wiederfindungsrate von 93,01 % war die von AULETTA (mindestens 65 - 75 % für Extraktion und Chromatographie) angegebene Methode den anderen eindeutig überlegen: VAN ORDEN 60,99 % (82,6 $\pm$ 2,2 %) und JAFFE 69,05 % (97,6 %). In Klammern sind die Angaben der Autoren den eigenen Ergebnissen gegenübergestellt.

Für die Gruppentrennung der Prostaglandine verwendete ich die Silicatsäure-Säulenchromatographie, ein von den meisten Autoren benutztes Verfahren mit hoher Effizienz. Ich habe die Angaben nach JAFFE (1974) und VAN ORDEN (1973) hinsichtlich ihrer Praktikabilität und der Wiederfindungsrate überprüft, jedoch war in unseren Versuchen keine Methode der anderen eindeutig überlegen. Für die weiteren Versuche wurde aus technischen Gründen die Methode nach VAN ORDEN bevorzugt. Für Extraktion und Chromatographie fand ich bei einer Anzahl von 32 Plasmaproben eine Wiederfindungsrate von 85,7 %. Die Werte anderer Autoren lagen bei 80 % (HILLIER K. et al. 1974), 75 % (ZAHRADNIK H.P. et al. 1976), 68,9 $\pm$ 6,6 % (JAFFE B.M. 1974), 68,3 % (VAN ORDEN D.E. 1973), 65 - 75 % (AULETTA 1974), 75 - 85 % (CALDWELL B.V. et al. 1971).

Der Assay wurde zunächst nach Anleitung des Herstellers ausgeführt, die auf den grundlegenden Arbeiten von CALDWELL (1971) und JAFFE (1971) basiert. Die Erstellung der Eichkurve war ohne Schwierigkeiten möglich; geringe Formabweichungen

der Eichkurve bei Verwendung verschiedener RIA-Kits sind durch die Herstellungsqualität des Antikörpers bedingt. Die Eichkurve ist im wesentlichen identisch mit der anderer Autoren.

Bei der Auswertung der Plasmaproben ergaben sich bei nur 3 von 32 Proben gute Übereinstimmungen der ermittelten PG-Werte in der 0,2- und 0,4 ml Fraktion. Bei den anderen Proben ergaben sich teilweise erhebliche Differenzen zwischen beiden Fraktionen, oder sie waren nicht mehr auf der Eichkurve ablesbar. Insgesamt waren die ermittelten Werte in allen Schwangerschaftswochen in der gleichen Größenordnung.

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit des Assay war es notwendig, einzelne Teilschritte genauer zu untersuchen und den Assay neu einzustellen.

Eine fast optimale Bindungskapazität von 47,32 % ergab sich bei einer eingesetzten Konzentration von ^{3}H-PG-$F_{1\alpha}$ von nur 0,06 µCi/ml, und dies nach Verwendung von Reagenzgläsern mit organischem Lösungsmittelrückstand. Letzteres ist notwendig, um die gleichen Reaktionsbedingungen zu erhalten, die auch für die Plasmaproben gelten. Die Bindungskapazität verringert sich unter diesen Bedingungen um durchschnittlich 2 %. Die Bindungskapazität ist jedoch bei jedem Assay neu zu ermitteln, da die Änderung der Antikörpereigenschaften Änderungen der Bindungskapazität bedingt.

Die Absorption radioaktiver Strahlung durch Plasmarückstände bei der Auswertung der Proben im Scintillationszähler kann mit Sicherheit verneint werden.

Während der Hersteller des Assay keine Angaben zur Kontaktzeit der Holzkohle mit dem Reaktionsgemisch macht (Punkt 8 und 9 der Anleitung), ist gerade die exakte Einhaltung einer bestimmten Zeit für alle Proben unerläßlich. Es konnte gezeigt werden, daß bei zunehmender Kontaktzeit immer mehr AG-AK-Komplexe aus der Bindung gelöst werden und damit falsche Ergebnisse liefern. Dies ist insbesondere bei der Verarbeitung einer größeren Plasmamenge von Wichtigkeit und ohne automatische Dosiergeräte kaum möglich.

Eine Änderung oder Zerstörung der antigenen Eigenschaften der PG, bedingt durch die Zwischenlagerung im Kühlschrank nach der Extraktion und Chromatographie, konnte nicht nachgewiesen werden. Auch ohne Unterbrechung der Analyse durch Zwischenlagerung konnten keine höheren PG-F-Konzentrationen im Plasma gefunden werden.

Die Gesamt-Recovery für den Assay lag bei 70 %. Sie wurde ermittelt nach Zugabe bekannter Mengen PG-$F_{1\alpha}$ in das Plasma und der noch vorhandenen Menge nach dem Assay anhand der Eichkurve. R.M. GUTIERREZ CERNOSEK (1972) gibt eine Gesamt-Wiederfindungsrate für unmarkiertes PG-F von 78 % an, VAN ORDEN (1973) fand einen Wert von 94 %.

Durch die Untersuchung einer größeren Plasmamenge (1 ml) neben der von anderen Autoren angegebenen 0,2 und 0,4 ml Fraktion bei einer zuvor genau ermittelten Bindungskapazität von 47,32 % (0,06 µCi/Probe ^{3}H-PG-$F_{1\alpha}$) konnte der Ablesebereich in der Eichkurve in einen stabileren Bereich verlagert werden. Die gefundenen Gesamtkonzentrationen lagen bei allen drei Fraktionen in der gleichen Größenordnung; eine genaue Aussage bezüglich der Konzentrationen konnte wegen der geringen Fallzahl nicht gemacht werden.

Nach Änderung des Assay in folgenden Punkten: 1. Konzentration des Tracers: 0,06 nCi/ml, 2. Doppelbestimmung von 2 x 1 ml Plasma, 3. Kontaktzeit für Holzkohle = 5 min für alle Proben, 4. Vorbehandlung der zur Gewinnung der Eichkurve benötigten Gläser mit Lösungsmittelrückständen, sind nun 213 Plasmaproben aus der 12. - 40. SSW untersucht worden.

Die Auswertung ergab PG-F-Konzentrationen zwischen 22,5 pg und 59,5 pg, wobei der niedrigste Wert in der 24. SSW und der höchste Wert in der 40. SSW gemessen wurde. In allen Schwangerschaftswochen war eine große Streubreite der PG-F-Konzentrationen zu beobachten. Die Übereinstimmung der Ergebnisse durch die Doppelbestimmung jeder Plasmaprobe war gut.

Bei Berücksichtigung einer Gesamtwiederfindungsrate von 70 % ergeben sich somit Werte zwischen 32,14 pg und 85 pg für den Schwangerschaftsverlauf.

Legt man bei der Auswertung der Plasmaproben die Eichkurve B zugrunde (siehe Seite 48), bei der die bekannten Konzentrationen von PG-F direkt in das Plasma gegeben wurden und nach Extraktion und Chromatographie die Eichkurve erstellt wurde, erhält man PG-F-Konzentrationen zwischen 48 pg und 109 pg. Es ist damit eine gute Übereinstimmung zwischen der rechnerisch und experimentell ermittelten PG-F-Konzentration erreicht.

Mit diesen Ergebnissen können die Untersuchungen anderer Autoren (BRUMMER 1972, 1973, JOHNSON 1975, GUTIERREZ-CERNOSEK 1972, TWOMEY 1975) bestätigt werden, wonach sich im Plasma kein Anstieg von PG-F gegen Ende der Schwangerschaft nachweisen läßt, wie er für die Amnionflüssigkeit nachgewiesen ist. Bezüglich der Konzentrationsangaben sind bei den einzelnen Autoren große Unterschiede festzustellen, was sich mit dem zur Zeit noch nicht verfügbaren standardisierten Radioimmunoassay für PG-F begründen läßt. Aus dem gleichen Grunde waren große Schwankungen der PG-F-Konzentration in den einzelnen Schwangerschaftswochen festzustellen, weshalb Einzelbestimmungen von PG-F in der Schwangerschaft als Screening Methode z.Zt. noch nicht möglich sind.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Ziel der Arbeit war es, Prostaglandin-F im Schwangerenplasma (12. - 40. SSW) quantitativ nachzuweisen, um somit neue Erkenntnisse über die Veränderungen von PG-F während der Schwangerschaft - insbesondere im letzten Trimenon - zu gewinnen. Verwendet wurde Plasma von Frauen mit klinisch unauffälliger Schwangerschaft. Das Plasma wurde vor der Auswertung im Radioimmunoassay extrahiert (Trennung der PG von den übrigen Plasmabestandteilen) und chromatographiert (Gruppentrennung der PG). Die Effizienz dieser Aufbereitung, gemessen an der Wiederfindungsrate von ^{3}H-$PGF_{1\alpha}$ liegt für die Extraktion zwischen 60,99 % und 93,01 % (Methode nach AULETTA 1974) und für die Chromatographie zwischen 80,58 % und 92,16 % (Methode nach VAN ORDEN 1973). Für die Auswertung der Plasmaproben wurde das Plasma nach der Methode von AULETTA (1974) extrahiert und nach VAN ORDEN (1973) chromatographiert. Der Radioimmunoassay wurde nach Angaben des Herstellers (Fa. Calbiochem, Calif.) ausgeführt. Die Erstellung der Eichkurve war ohne Schwierigkeiten möglich. Die Ergebnisse der Untersuchung von Plasmaproben waren wegen der geringen Empfindlichkeit des Assay nicht befriedigend und ergaben in allen Schwangerschaftswochen PG-F-Werte der gleichen Größenordnung.

Folgende Teilschritte des Assay wurden zur Standardisierung und Steigerung der Empfindlichkeit eingehender untersucht: 1. die Bindungskapazität - eine BK von 47,32 % wurde erreicht mit einer Konzentration des Tracers von 0,06 µCi/ml; 2. der Quench-Effekt - ein Q-Effekt für ^{3}H-PG-$F_{1\alpha}$ war nicht nachweisbar; 3. die Kontaktzeit des Reaktionsgemisches mit der Holzkohle - sie liegt mit 5 min im stabilen Bereich und ist exakt einzuhalten; 4. Einfluß der Zwischenlagerung der Plasmaproben im Gefrierschrank - die Nachweisempfindlichkeit für PG-F wurde nicht beeinträchtigt; 5. die Gesamt-Recovery - sie lag bei 70 %; 6. größere Plasmafraktionen - dadurch konnte die Nachweisempfindlichkeit gesteigert werden.

Aufgrund dieser eigenen Ergebnisse wurde der Assay nach neuem

Versuchsaufbau ausgeführt und eine größere Anzahl Plasmaproben untersucht. Die ermittelten PG-F-Konzentrationen in den einzelnen Schwangerschaftswochen waren nicht signifikant verschieden. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse in der Doppelbestimmung der Plasmaproben. In allen Schwangerschaftswochen war eine große Streubreite in den ermittelten PG-F-Konzentrationen festzustellen. Die Serumkonzentrationen während der Schwangerschaft lagen zwischen 32,14 - 85,0 pg/ml, wobei niedrigste Werte in der 24. SSW und höchste Werte in der 40. SSW gemessen wurden.

Diese Ergebnisse sind im wesentlichen identisch mit denen anderer Autoren, wonach die im III. Trimenon ansteigende Konzentration von PG-F in der Amnionflüssigkeit nicht im Plasma nachgewiesen werden kann. Außerdem sind Einzelbestimmungen von PG-F in der Schwangerschaft als Screening Methode wegen der geringen Empfindlichkeit des zur Zeit zur Verfügung stehenden Assay noch nicht möglich.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ÄRZTLICHE PRAXIS:
   93 (1972) 4568

2. AMIN, M.J.:
   Direct quantitative thin-layer chromatographie determination of prostaglandins A_2, B_2 and $F_{2\alpha}$.
   J.Chromatogr. 108(2) 1975, 313-21, 21

3. ANGGARD, E.:
   Guidlines for the evaluation of RIA methods for prostaglandins.
   Prostaglandins (Los Altos, C.) 15 (1), (1978)

4. AULETTA, F.J., et al.:
   Development and standardization of radioimmunoassays for Prostaglandins E, F, and A.
   Clin.Chem. 20(12) (1974) 1580-7

5. AXEN, U., GREEN, K., HÖRLEIN, D., SAMMUELSSON, B.:
   Mass spectrometric determination of picomole amounts of prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ using synthetic deuterium labeled carriers.
   Biochem.Ciophys.Res.Commun. 45 (1971) 519-525

6. BERGSTRÖM, S., SJÖVALL, J.:
   The isolation of Prostaglandin.
   Acta Chem.Scand. 11 (1957) 1086

7. BERGSTRÖM, S., SJÖVALL, J.:
   The isolation of Prostaglandin F from sheep prostate glands.
   Acta.Chem.Scand. 14 (1969) 1693-1700

8. BLATCHLEY, F.R., et al.:
   Proceedings: Utero-ovarian venous plasma levels of prostaglandin F alpha progesterone and oestradiol in non-pregnant and early pregnant guinea-pigs.
   J.Endocrinol. 64 (1) (1975) 12 P

9. BRUMMER, H.C.:
   Serum $PGF_{2\alpha}$ levels during late pregnancy, labour and the puerperium.
   Prostaglandins 2 (1972) 185-194

10. BRUMMER, H.C.:
    Serum $PGF_{2\alpha}$ levels during human pregnancy.
    Prostaglandins 3 (1973) 3

11. CALDWELL, B.V., BURSTEIN, S., BROCK, W.A.:
    Radioimmunoassay of the F Prostaglandins.
    Clinical Endocrinol. 33 (1971) 171-175

12. CHALLIS, I.R.:
A comparison between the concentration of prostaglandin F in human plasma and serum.
Prostaglandins, 5 (1974) 1 27-31

13. CHALLIS, I.R.G., OSATHANONDH, R., RYAN:
Maternal and fetal plasma prostaglandin levels at vaginal delivery and cesarean section.
Prostaglandins 6 (1974) 281

14. CHARBONNEL, B.:
Dosage radioimmunolique des prostaglandines F.
Anuales d'Endocrinoligie 34(6) (1973) 722-4

15. CHARBOUNAL, B.:
Radioimmunoassay of PG-E and PG-F_{α} in human plasma.
Prostaglandins, 5 (2) 173-4 (1974)

16. CUTHBERT, M.F.:
The prostaglandins.
(1973)

17. CORNETTE, J.C., et al.:
Preparation and quantitation of urinary metabolites of Prostaglandin $F_{2\alpha}$ by radioimmunoassay.
Prostaglandins 9 (2) (1975) 323-38

18. CSAPO, A.J., HENZE, M.R., KAIHOLA, H.L.:
Suppression of uterine activity and abortion by inhibition of prostaglandin synthesis.
Prostaglandins 7:39 (1974)

19. DIPALMA, J.R.:
Aspirin-like drugs and prostaglandins.
American Family Physician 12 (1) (1975) 120-1

20. DREWES, P.A.:
Modified radioimmunoassay of prostaglandin $F_{2\alpha}$ using commercially available reagents.
Clinical Biochemistry 4 (1974) 378-86

21. EMBREY, M.P., zit. nach PICKLES, V.R., et al.:
Spasmogenic action.
Med.Soc.Endocr. 14, 90 (1966)

22. EULER, U.S.:
Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.path.Pharmak. 175, 78 (1934)

23. EULER, U.S.:
On the specific vaso-dilatating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and animal (prostaglandin and vesiglandin).
J.Physil. (Lond.) 88, 213 (1936)

24. FERREIRA, S.H., VANE, I.R.:
Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation.
Nature 216 (1967) 868-873

25. FERREIRA, S.H., MONCADA, S., VANE, J.R.:
Indometacin and Aspirin abolish prostaglandin Release from Spleen.
Nature New Biology 231 (1971) 237-239

26. GILLESPIE, A., BEAZLY, J.M., DORP, D.A. van:
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth. 78 (1971) 301

27. GIRARD, J.:
Editorial: Radioimmunoassay.
Praxis 63 (3) (1974) 59-61

28. GLOGNER, P.:
Radioimmunologische Bestimmungsmethoden für Arzneien.
Internist 16 (3) (1975) 133-4

29. GOLDBERG, V.J., et al.:
Role of Prostaglandins in reproduction.
Physol.Rev. 55 (3) (1975) 325-51

30. GOLDBLATT, M.W.:
A depressor substance in seminal fluid.
J.Soc.Schem.Ind. (Lond.) 52 (1933) 1056-1057

31. GOLDBLATT, M.W.:
Properties of human seminal plasma.
J.Physiol. (Lond.) 84 (1935) 202-218

32. GRANSTRÖM, E.:
On metabolism of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in female subjects. Structures of two metabolites in blood.
Europ.J.Biochem 27 (1972) 462

33. GRANSTRÖM, E.:
Radionimmunoassay of prostaglandins.
Prostaglandins 15 (1) (1978) 3-17

34. GREEN, K., BYGDEMAN, M., TOPPOZADA, M.:
Kinetic and metabolic studies of prostaglandin $F_{2\alpha}$ administered intra-amnotically for induction of abortion.
Life Sciences 14 (1974) 2285

35. GREEN, K., BYGDEMAN, M., TOPPOZADA, M.:
The role of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in human partitution. Endogenous plasma levels of 15-Keto-13,14 dihydroxy-$PGF_{2\alpha}$.
Am.J.Obstet.Gynec. (1974)

36. GREEN, K., SAMUELSSON, B.:
Endogenous plasma levels of 15-Ketodihydro-prostaglandin in human plasma. Parameters for monitoring prostaglandin synthesis.
Biochemical Medicine (1974)

37. GUTIERREZ-CERNOSEK, et al.:
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in peripheral sera of man.
Prostaglandins 1 (1972) 71

38. GUTIERREZ-CERNOSEK, R.M., ZUCKERMAN, J.:
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in sera during human Pregnanca.
Prostaglandins 1 (1972) 331

39. GUTIERREZ-CERNOSEK, R.M., MORRIL, L.M., LEVINE, L.:
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in peripheral sera of man.
Prostaglandins 3 (1972) 223-227

40. HAMBERG, M.:
Studies of the biosynthesis and metabolism of prostaglandins.
(1968)

41. HAMBERG, M.:
Quantitative studies on prostaglandin synthesis in man II.
Analytical Biochemistry 55 (1973) 368

42. HAMBERG, M.:
Inhibition of prostaglandin synthesis in man.
Biochemical and Biophysical Research Commun 49 (1972) 720

43. HEINZL, S.:
Clinical use of prostaglandins in obstetrics and gynäcology.
Schweizer Medizin.Wochenschrift 108 (17) (1978) 635-9

44. HENNAM, I.F.:
Radioimmunoassay of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in peripheral venous blood from men and women.
Prostaglandins 5 (6) (1974) 531-42

45. HENSBY, C.N., et al.:
Proceedings: The quantitative assay of prostaglandin E_2 and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in biological extracts using a Finnigan 3000 D quadrupole mass spectrometer.
Br.J.Pharmacol. 52 (1) (1974) 148-149

46. HERTELENDY, F., WOODS, R., JAFFE, B.M.:
Prostaglandin E levels in peripheral blood during labour.
Prostaglandins 3 (1973) 223

47. HEUER, F.:
Zur Wirkung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Prostaglandin Synthesehemmern auf die Herzfrequenz des Rattenfeten.
Inaugural-Dissertation (1977)

48. HILLIER, K., CALDER, A.A., EMBREY, M.P.:
Concentrations of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in amnotic fluid and plasma in spontaneous and induced labour.
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth. 81 (1974) 257

49. HILLIER, K., DILLEY, S.R.:
Prostaglandins 5 (1974) 137

50. HORTON, E.W.:
Prostaglandins.
(1972)

51. HÜBSCHEN, K.:
Die Behandlung der vorzeitigen Wehentätigkeit mit Partusisten.
Med.Welt 26 (1975) 1188-1192

52. JAFFE, B.M., SMITH, I.W., NEWTON, W.T.:
Radioimmunoassay for prostaglandins.
Science 171 (1971) 494-496

53. JAFFE, V.M., BEHRMANN, H.R.:
Radioimmunoassay measurement of prostaglandin E, A, and F in human plasma.
Journal of Clinical Investigation 52 (1973) 389

54. JAFFE, B.M., PARKER, C.W.:
Physiologic implications of prostaglandin radioimmunoassay.
Metabolism 22 (1973) 1129-1137

55. JAFFE, B.M.:
Radioimmunoassay for prostaglandins.
Radioassays in Clinical Medicine (1974)

56. JOHNSON, D.A. et al.:
The concentration of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in maternal plasma foetal plasma and amnotic fluid during pregnancy in women.
Acta Endocrinol. (Kbh) 79(3) (1975) 589-97

57. KARIM, S.M.M., TRUSSEL, R.R., PATEL, R.C.:
Response of the pregnant human uterus to prostaglandin $F_{2\alpha}$ induction of labour.
British Med.J. 4 (1968) 621

58. KARIM, S.M.:
Appearance of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in blood during labour.
Brit.Med.J. 4 (1968) 618-621

59. KEIRSE, M.J.N.C., TURNBULL, A.C.:
E prostaglandins in amnotic fluid during late pregnancy and labour.
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth. 80 (1973) 970

60. KEIRSE, M.J.M.C., FLINT, A.P.F., TURNBULL, A.C.:
F prostaglandins in amniotic fluid during pregnancy and labour.
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth. 81 (1974) 131-5

61. KEIRSE, M.J. et al.:
Metabolism of prostaglandin $F_{2\alpha}$ within the human uterus in early pregnancy.
Br.J.Obstet.Gynaecol. 822 (1975) 142-5

62. KEIRSE, M.J.:
Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in the pregnant human uterus.
Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 4 (1978) 87-102

63. KELLY, R.W.:
Physical methods of measurement of prostaglandins.
Clinics in Endocrinology and metabolism 2(26) (1973) 375-92

64. KIRTON, K.R., CORNETTE, I.C., BARR, K.L.:
Characterization of antibody to prostaglandin $F_{2\alpha}$.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 47 (1972) 903-909

65. KOPECHY, P.:
Prostaglandins and induction of abortion.
Hippokrates 46(1) (1975) 117-9

66. LABHSETWAR, A.P.:
Prostaglandin E_2.
Periodica (1972)

67. LEVINE, L., GUTIERREZ-CERNOSEK, R.M.:
Specificities of prostaglandins B_1, $F_{1\alpha}$ and $F_{2\alpha}$ antigen-antibody reactions.
J.Biol.Chem. 239 (1971) 6782-6785

68. LEWIS, R.B., SCHULMANN, J.D.:
Aspirin and labour.
Lancet 11 (1973) 1159

69. LUNSTRÖM, V., et al.:
Endogenous levels of prostaglandin $F_{2\alpha}$.
American J.of Obstet.and Gynaecol. 130(6) (1978) 640-6

70. MAATHUIS, J.B.:
Cyclic changes in the concentration of Prostaglandin $F_{2\alpha}$.
Brit.Journal of Obstetrics and Gynaecolg. 85(3) (1978)

71. MARTIUS, G.:
Lehrbuch der Geburtshilfe.
Thieme Verlag Stuttgart, 8. Aufl. (1974)

72. MOSLER, K.H., CZEKANOWSKI, R., DORNHÖFER, G.:
Comparative Studies of the Effect of Oxytocin and Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the Uterus.
Advances in the Biosciences Internat.Conference on Prostaglandins 251028 (1972)

73. MOSLER,K.H., DORNHÖFER, W., LINKA, F.:
Hemmung vorzeitiger Wehen.
Med.Klinik 69 (1974) 97-101

74. NOVY, M.J., COOK, M.J., MANAUGH, L.:
Indomethacin block of normal onset of paeturition in primates.
Am.J.Obstet.Gynaec. 118 (1974) 412

75. ORCZYK, G.P., BEHRMAN, H.R.:
Ovulation blockade by aspirin or indomethacin in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotropin secretion.
Prostaglandins 1,3 (1972) 20

76. PATRONO, C.:
Radioimmunoassay of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in unextracted human plasma.
J.of Nuclear Biology and Medicine (1973)

77. PESKAR, B.M.:
Radioimmunoassay of prostaglandins.
Zeitschrift für Gastroenterologie 16(5) (1978) 341-8

78. PEXTON, et al.:
Prostaglandins F in uterine and ovarian venous plasma from nonpregnant ewes collected by cannulation.
Prostaglandins 9(3) (1975) 501-9

79. PIPER, P.J., VANE, J.R., WYLLIE, J.H.:
Inaktivation of prostaglandins by the lungs.
Nature 225 (1970) 600-604

80. RAIJ, K., et al.:
Cyclic adenosine 3'-5' monophosphate in prostaglandin-induced abortion.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 34(4) (1974) 337-42

81. RAMWELL, P.W.:
The Prostaglandins.
Plenum Pr. (1973)

82. RAZ, A.:
Interaction of prostaglandins with blood plasma proteins.
Biochem.J. 130 (1972) 631-636

83. ROTH-BRANDEL, U.:
A comparative Study on the Influence of Prostaglandin E_1 oxytocin u. ergometrin on the pregnant human uterus. (1970)

84. SAMUELSSON, B.:
Prostaglandins.
Annual Review of Biochemistry 44(321) (1975) 669-95

85. SAMUELSSON, B.:
The synthesis and biological role of prostaglandins.
Biochem.Soc.Symp. (35) (1972) 101-2

86. SALMON, J.A., AMY, J.J.:
Levels of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in amnotic fluid during pregnancy and labour.
Prostaglandins 4 (1973) 523

87. SALMON, J.A., et al.:
A radioimmunoassay of 15(s) 15 methyl-prostaglandin $F_{2\alpha}$.
Prostaglandins 9(2) (1975) 339-46

88. SCHMIDT-MATTHIESEN, H.:
Gynäkologie und Geburtshilfe.
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart (1976)

89. SHARMA, S.C., et al.:
Prostaglandins $F_{2\alpha}$ concentration in peripheral blood during first stage of normal labour.
British medicla Journal 1 (1973) 709

90. SHAW, J.E., RAMWELL, P.W.:
Separation identification and estimation of prostaglandins.
Methods Biochem.Anal. 17 (1969) 325-271

91. SINGH, E.J., et al.:
Silica gel impregnated glass fiber paper chromatography for separation and identification of prostaglandins.

92. SINGH, E.J., et al.:
Levels of prostaglandins $F_{2\alpha}$ and E_2 in human endometrium during the menstruai cycle.
Am.J.Obstet.Gynaecol. 121(7) (1975) 1003-6

93. SMITH, M.J., et al.:
Prostaglandins and the anti-inflammatory activities of aspirin and sodium salicylate.
J.Pharm.Pharmacol. 27(7) (1975) 473-8

94. SZEDERKENYI, F., et al.:
Determination of the active ingredient content of $PGF_{2\alpha}$ by gas liquid chromatography.
Prostaglandins 8(4) (1974) 285-96

95. THIELE, O.W.:
Prostaglandins, thromboxane, prostacyclin.
Hippokrates 49(2) (1978) 179-81

96. TOBIAS, L., et al.:
Chromatographie of prostaglandins utilizing silic acid impregnated glass fiber sheets.
Prostaglandins 9(1) (1975) 57-60

97. TWOMEY, S.L., et al.:
Serum prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels during normal pregnancy.
Clin.Biochem. 8(1) (1975) 60-1

98. VANE, J.R.:
Inhibitors of prostaglandin, prostacyclind and thromboxane.
Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 4 (1978) 231-7

99. VLOUTZOU, K., et al.:
$F_{2\alpha}$ prostaglandin levels in mothers and infants.
Biology of Neonate 32(5-6) (1977) 343-5

100. WIQUIST, BYGDEMAN:
Endogenous prostaglandins and the initiation of labour.
Acta Obstet.Gynaec.Scand. 37 (1975) 7-16

101. YOUSSEF NEYADIAN, E.:
Simple direkt Radioimmunoassay of the F prostaglandin.
Prostaglandins 6(1) (1974) 23-35

102. ZAHRADNIK, H.P.:
Methodischer Beitrag zur radioimmunologischen Prostaglandinbestimmung im Plasma.
Archiv für Gynäkologie 219 (1-4) (1975) 503-4

103. ZAHRADNIK, H.P., GEISTHÖVEL, F., WEITZELL, R., BRECKWOLDT, M.:
Prostaglandin-F-Spiegel im menschlichen Plasma während der späten Schwangerschaft und während der Wehentätigkeit.
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 9 (1976) 710-714

Ich danke Herrn Prof. Dr. Brandau, der die Bearbeitung des Themas anregte und mich in die endokrinologische Labordiagnostik einführte, sowie für wesentliche Hinweise und die Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Brandau, die mich durch wertvolle labortechnische Hinweise bei der Durchführung der Arbeit unterstützte.

Herr Dr. med. Mutzke war mir freundlicherweise beim Sammeln der Plasmaproben behilflich.

Herrn Prof. Dr. Wulf danke ich für die Übernahme des Korreferates.

L E B E N S L A U F

Geboren in Bingen-Dromersheim am 26. Juli 1949 als erster Sohn des Bundesbahnbeamten Josef Albert und seiner Frau Theresia, geborene Gillenberg, besuchte ich in meiner Heimatstadt die Volksschule. Meine Lehrzeit von 1964 - 1967 bei der Deutschen Bundesbahn in Mainz beendete ich mit der Gesellenprüfung für Starkstromelektriker. Die Fachschulreife erwarb ich an der Berufsaufbauschule Bingen von 1968 - 1969, meine Hochschulreife am Ketteler-Kolleg Mainz von 1970 - 1972. 1972 immatrikulierte ich mich an der Universität Würzburg für das Studium der Medizin, das ich 1978 mit dem Staatsexamen abschloß. Mit der Ärztin Hildegard, geborene Nätscher, bin ich seit 1972 verheiratet. Im Januar 1979 begann ich mit der gynäkologisch-geburtshilflichen Fachausbildung.

Peter Albert

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80